



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

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA  
FORMACIÓN DE ADHERENCIAS *in vitro* DE CEPAS DE *KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE* Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AISLADAS DE  
GRANJAS LECHERAS EN CHILE**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal

**BRANDON ALFREDO GONZÁLEZ CÓRDOVA**

**CHILLÁN – CHILE**

**2026**

Profesor Guía: Marcos Alberto Muñoz Domon  
Departamento de Ciencia Animal  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción

Profesor Guía

---

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

Profesor Guía Externo

---

Dr. Marcos Veiga Dos Santos  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Tomás Casanova Bustos  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

---

Dr. Jorge Ávila Stagno  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Carlos Landaeta Aqueveque  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMEN.....	vi
SUMMARY.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	13
III. MATERIALES Y MÉTODO.....	15
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
V. CONCLUSIONES.....	51
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	PÁGINA
<b>EN EL TEXTO</b>	
1. Criterios de caracterización morfológica de las colonias de coliformes aisladas en agar Columbia-Sangre y agar MacConkey de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el periodo de octubre del 2023 a junio del 2024, según describe el Consejo Nacional de la Mastitis (NMC, 2017), con modificaciones.....	20
2. Criterios de interpretación de perfiles bioquímicos y pruebas de motilidad para el diagnóstico presuntivo de especies bacterianas coliformes de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el periodo de octubre del 2023 a junio del 2024, según describe el Consejo Nacional de la Mastitis (NMC, 2017), con modificaciones.....	21
3. Selección de aislados presuntivos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> identificados mediante microbiología convencional para ratificación a nivel de especie mediante técnica MALDI-TOF MS, según describe (Hylland et al., 2018) Considerando un score de identificación $\geq 2.0$ según las instrucciones de VITEK® MS (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France).....	34
4. Caracterización genética y perfiles de adherencia <i>in vitro</i> de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de infecciones intramamarias y leche de tanque de 8 granjas lecheras de la región de Los ríos y la región de Ñuble.....	43
5. Caracterización genética y perfiles de adherencia <i>in vitro</i> de aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de leche de tanque y adherencias a superficies de equipos de ordeño de 5 granjas lecheras de la región de Ñuble.....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Frecuencia y distribución relativa porcentual inicial de especies bacterianas identificadas mediante técnicas de microbiología convencional de consenso internacional de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el período de octubre del 2023 a junio del 2024.....	33
2. Frecuencia y distribución relativa porcentual actualizada de especies bacterianas identificadas mediante técnicas de microbiología convencional de consenso internacional y confirmadas mediante MALDI-TOF de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el período de octubre del 2023 a junio del 2024.....	37
3. Patrones de banda de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtenidos mediante RAPD-PCR utilizando set de primers ERIC2 - ERIC1026, para tipificación molecular de 9 aislados según describe Muñoz et al. (2007), recuperados de infecciones intramamarias subclínicas y leche de tanque, provenientes 1 granja de la región de Los Ríos y 7 granjas diferentes en la región del Ñuble, respectivamente.....	41
4. Patrones de banda de aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtenidos mediante RAPD-PCR utilizando set de primers ERIC2-ERIC1026, para tipificación molecular de 7 aislados según describe Muñoz et al. (2007), recuperados de leche de estanque y adherencias en superficies de equipo de ordeño, provenientes de 10 granjas diferentes en la región del Ñuble.....	43

## RESUMEN

### **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE ADHERENCIAS *in vitro* DE CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* Y *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AISLADAS DE GRANJAS LECHERAS EN CHILE**

Las infecciones intramamarias (IMIs) son las afecciones más comunes y prevalentes en rebaños lecheros bovinos a nivel mundial. Las IMIs bovinas son producidas generalmente por patógenos de tipo bacteriano provenientes de diversas fuentes y/o reservorios presentes en las granjas lecheras. Ambas, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, corresponden a patógenos bacterianos que pueden aislarse de cuadros de IMI en rebaños lecheros y también pueden estar presentes en biopelículas establecidas en las superficies de equipos de ordeño en granjas lecheras. Esto último toma importancia considerando el rol que tienen las biopelículas bacterianas como fuente y/o reservorio tanto para IMI en vacas susceptibles, como fuente de contaminación para la leche de tanque (BTM) en granjas lecheras.

El presente estudio evaluó y caracterizó la diversidad genética y la habilidad de formación de adherencias *in vitro* de cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, utilizando RAPD-PCR y ensayo en placas de microtitulación (MPA), respectivamente. Las cepas de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, fueron aisladas de cuartos mamarios con IMI, leche de tanque (BTM) y adherencias a superficies de equipos de ordeño (AMES).

Dentro de los resultados de la tipificación genética se obtuvieron 5 y 8 tipos de RAPD para *K. pneumoniae* (A, B, C, D, E) y *P. aeruginosa* (A, B, C, D, E, F, G, H), respectivamente, con un alto poder de discriminación en la evaluación de ambas especies bacterianas. Con respecto, a la evaluación de formación de adherencia in vitro, para cepas de *K. pneumoniae* se pudo observar que el 42,85% (n=3), el 28,57% (n=2), el 14,28% (n=1) y el 14,28% (n=1), poseían un alta, media alta, media y baja habilidad de adherencia in vitro, respectivamente. Sin embargo, para las cepas de *P. aeruginosa* se obtuvo un 22,22% (n=2), un 44,44% (n=4), un 22,22% (n=2) y un 11,11% (n=1), de cepa con una habilidad de adherencia in vitro alta, media alta, media y baja, respectivamente. Sumado a lo anterior, este estudio destaca que, los aislados de *P. aeruginosa* de IMI RAPD Tipo A, posiblemente tengan un comportamiento epidemiológico contagioso entre cuartos mamarios de vacas susceptibles. Finalmente, ambos aislados de *P. aeruginosa* de IMI RAPD Tipo A, no necesariamente destacan por su alta habilidad de adherencia in vitro, implicando que probablemente otros mecanismos de virulencia complementarios están involucrados en la generación de una IMI exitosa en esta especie bacteriana.

**Palabras clave:** infecciones intramamarias, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, biopelículas, diversidad genética, granjas lecheras.

## **SUMMARY**

### **MOLECULAR CHARACTERIZATION AND *in-vitro* ADHERENCES FORMATION ASSESMENT OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED FROM DAIRY FARMS IN CHILE**

Intramammary infections (IMIs) are among the most common and prevalent disease in dairy cows around the world. Bovine IMIs are generally caused by bacterial pathogens originating from diverse sources and reservoirs present on dairy farms. Both *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* are bacterial pathogens that can be isolated from IMI cases on dairy herds and may also be present in biofilms established on the of milking equipment surfaces on dairy farms. This is particularly relevant considering the role of bacterial biofilms as a source and reservoir of IMI in susceptible cows, as well as a source of contamination for bulk tank milk (BTM) on dairy farms.

The present study evaluated and characterized the genetic diversity and the in vitro adherence forming ability of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolates using RAPD-PCR and a microtiter plate assay (MPA), respectively. Isolates of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were obtained from mammary quarters with IMI, bulk tank milk (BTM), and adherences on milking equipment surfaces (AMES).

Genetic typing results showed 5 and 8 RAPD Types for *K. pneumoniae* (A, B, C, D, E) and *P. aeruginosa* (A, B, C, D, E, F, G, H), respectively, with a high discriminatory power for both bacterial species. Moreover, the *in vitro* adherence ability assessment revealed that *K. pneumoniae* strains exhibited, high, medium-high, medium, and low adherence abilities in 42.85% (n=3), 28.57% (n=2), 14.28% (n=1), and 14.28% (n=1), respectively. In contrast, *P. aeruginosa* strains showed high, medium-high, medium, and low *in vitro* adherence formation ability in 22.22% (n=2), 44.44% (n=4), 22.22% (n=2), and 11.11% (n=1), respectively. In addition, this study highlights that *P. aeruginosa* isolates from IMI classified as RAPD Type A may have a contagious epidemiological behavior between mammary quarters of susceptible cows. Finally, both *P. aeruginosa* IMI isolates RAPD Type A do not necessarily exhibit a high *in vitro* adherence formation ability, suggesting that other complementary virulence mechanisms are likely involved in the establishment or a successful IMI in this bacterial species.

**Keywords:** intramammary infections, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, adherences, biofilms, genetic diversity, dairy farms.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **Infección intramamaria bovina**

Desde el siglo pasado, la mastitis bovina (MB) se ha utilizado como un concepto general para describir una serie de afecciones de origen infeccioso, traumático o tóxico, que producen inflamación de la glándula mamaria bovina (Wenz et al., 2001; Porter et al., 2016; Cheng et al., 2020). Dentro de los rebaños lecheros, la MB es considerada la afección más relevante para el sector lácteo en términos económicos, debido a que ella provoca importantes pérdidas tanto en el sector productivo primario como en la industria procesadora en todo el mundo (Cheng et al., 2020; Fidelis et al., 2024). Con respecto al impacto económico negativo que produce la MB, éste se traduce principalmente en disminución de la producción y calidad de leche, disminución de la longevidad del rebaño, y aumento tanto en el costo de producción como en el costo de los tratamientos (Gröhn et al., 2005; Oliveira et al., 2013). En la gran mayoría de los casos de MB, existe una infección intramamaria (IMI) subyacente en la glándula afectada (Cheng et al., 2020). Estas IMI corresponden a una de las afecciones más comunes y prevalentes en rebaños lecheros a nivel mundial (Porter et al., 2016; Klaas & Zadoks, 2018; Pirner et al., 2024). Además, es importante destacar, que las IMI en bovinos son generalmente producidas por patógenos de tipo bacteriano (Burvenich et al., 2003). Sin embargo, también se describen IMI por algas,

levaduras y virus, entre otras (Zhao & Lacasse, 2008; Klaas & Zadoks, 2018; Cheng et al., 2020; USDA, 2024). Junto a lo anterior, la patogénesis de las IMI es principalmente determinada por el conjunto de factores de virulencia del patógeno bacteriano involucrado, la respuesta inmune propia de cada vaca y la interacción que estos factores tienen con el ambiente de la granja (Burvenich et al., 2003; Wenz et al., 2010; Klaas & Zadoks, 2018; Cheng et al., 2020). Adicionalmente, ante los diversos cursos de infección que los patógenos bacterianos producen, la definición general de IMI debe complementarse para sistematizar de manera más descriptiva su desarrollo y consecuencias patológicas (Burvenich et al., 2003; Schukken et al., 2011a). En este sentido, cuando el curso de la IMI produce un cuadro clínico visible en el animal, esta afección se describe como mastitis clínica (MC). Esta mastitis clínica puede ser clasificada dependiendo de los signos, el compromiso y el grado de inflamación presente (Klaas & Zadoks, 2018; Cheng et al., 2020). Esto significa que, en cuadros de MC, la manifestación de signos se puede observar: como anomalías físicas de la leche (mastitis leve), acompañada de una inflamación en la glándula mamaria (mastitis moderada), y en casos extremos incluyendo también signos clínicos de compromiso sistémico (mastitis severa) (Klaas & Zadoks, 2018; Cheng et al., 2020). Por otro lado, cuando se produce una IMI que no muestra signos clínicos visibles, ésta se describe usualmente como “mastitis subclínica” (Klaas & Zadoks, 2018). Esta afección se caracteriza por un aumento progresivo en el recuento celular somático (RCS) debido a la migración y acumulación de leucocitos en

la glándula mamaria afectada (Boutet et al., 2004). Además, cabe destacar que, en un porcentaje importante de los casos, es posible aislar el agente patógeno involucrado desde la leche de la glándula afectada (Munoz et al., 2007). Sin embargo, como resultado del equilibrio entre los factores de virulencia del patógeno bacteriano involucrado y los mecanismos inmunitarios del huésped, la respuesta inflamatoria clínica generalmente es modulada e inhibida (Boutet et al., 2004). Junto con lo anterior, en un número de casos de “mastitis subclínica” existe la probabilidad de desarrollar, tanto un curso de infección transitorio, como un curso de infección crónico persistente en el tiempo (Boutet et al., 2004; Schukken et al., 2011; Klaas & Zadoks, 2018; Cheng et al., 2020). Por consiguiente, dentro de las diferentes manifestaciones de IMI, la “mastitis subclínica” es la que produce mayores pérdidas económicas en los rebaños lecheros a nivel mundial (Pitkälä et al., 2004; Zhao & Lacasse, 2008; Schukken et al., 2011; Klaas & Zadoks, 2018).

### **Patógenos bacterianos involucrados en infección intramamaria**

Con relación a los patógenos bacterianos más comúnmente involucrados en casos de IMI, ellos pueden ser categorizados dependiendo de su cubierta externa como Gram-positivos y Gram-negativos (Pirner et al., 2024). Estos patógenos corresponden en su mayoría a los géneros y especies, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., y *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., y *Enterobacter* spp., respectivamente (Pirner et al., 2024). Junto a lo anterior,

los patógenos bacterianos también han sido clasificados en términos epidemiológicos como “contagiosos” y/o “ambientales” dependiendo de la naturaleza y el origen de sus reservorios (Cheng et al., 2020). Cabe destacar en este punto, que la prevalencia de IMI por patógenos contagiosos ha disminuido en los rebaños lecheros que han implementado estrategias de control y prevención efectivas (Bradley & Green, 2001; Schukken et al., 2012).

IMI producida por patógenos de origen principalmente ambiental, incluso en granjas lecheras bien manejadas (Schukken et al., 2012; Klaas & Zadoks, 2018). Junto con esto, cabe destacar que, las bacterias Gram-negativas forman parte importante de la etiología de IMI de origen ambiental en las granjas lecheras (Burvenich et al., 2003; Schukken et al., 2012). Por lo demás, la IMI provocada por bacterias Gram-negativas se caracteriza generalmente por la alta severidad de los cuadros clínicos presentados y una pérdida drástica en el volumen de leche producido (Schukken et al., 2009). Adicionalmente, la IMI por bacterias Gram-negativas también puede producir una disminución en la tasa de fertilidad, disminución en la tasa de concepción, e incluso un aumento en la tasa de eliminación del rebaño (Hertl et al., 2010; Shinozuka et al., 2016; Klaas & Zadoks, 2018; Dahl et al., 2018). Por otro lado, dentro de las bacterias Gram-negativas, las especies coliformes corresponden al grupo principal de patógenos ambientales causantes de IMI en rebaños lecheros (Burvenich et al., 2003; Y. Schukken et al., 2012). Junto a lo anterior, los patógenos coliformes responsables de producir IMI más frecuentemente son *E. coli* y *Klebsiella* spp. (Wenz et al., 2001; Erskine et al.,

2002; Roberson et al., 2004; Riekerink et al., 2008). Además, pese a que la IMI por *E. coli* tiene una mayor prevalencia en rebaños lecheros, la IMI producida por *Klebsiella* spp. también es frecuente y puede incluso, causar una mayor pérdida en la producción lechera (Erskine et al., 2002; Gröhn et al., 2005; Schukken et al., 2012).

### ***Klebsiella* spp. en infecciones intramamarias**

Las principales especies de *Klebsiella* que producen IMI en rebaños lecheros, corresponden a *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* (Munoz & Zadoks, 2007; Zadoks et al., 2011; Pirner et al., 2024). Por lo demás, *K. pneumoniae* es la especie de *Klebsiella* mayormente aislada de cuartos mamarios infectados, presentando una gran diversidad de cepas involucradas debido a su naturaleza principalmente ambiental ( Roberson et al., 2004; Munoz & Zadoks, 2007; Munoz et al., 2007). Cabe destacar en este punto, que *K. oxytoca* también posee un rol dentro de cuadros de IMI, pudiendo ser aislada potencialmente como patógeno de cuartos mamarios infectados y en leche de tanque (Ntuli et al., 2016; Massé et al., 2020; Pirner et al., 2024). No obstante, la tasa de prevalencia de IMI por *K. oxytoca* en rebaños lecheros, sigue siendo menor en comparación a la tasa de prevalencia de *K. pneumoniae* (Munoz & Zadoks, 2007; Zadoks et al., 2011; Pirner et al., 2024). Por otra parte, la IMI producida por *K. pneumoniae* es caracterizada generalmente por la transitoriedad y alta severidad de sus cuadros clínicos, la rápida progresión a

shock tóxico y la potencial muerte de las vacas afectadas (Wenz et al., 2001; Paulin-Curlee et al., 2008). Sin embargo, también puede existir la presentación de cuadros clínicos leves e incluso el desarrollo de un curso de infección subclínico por *K. pneumoniae* (Oliveira et al., 2013; Pirner et al., 2024). Llegando incluso a ser el agente causal de brotes de IMI por transmisión contagiosa en algunos rebaños (Munoz et al., 2007). Por lo demás, el cuadro de IMI producido por *K. pneumoniae* presenta una baja tasa de curación espontánea y una baja tasa curación bacteriológica (Schukken et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Fuenzalida & Ruegg, 2020; Schmenger & Kromker, 2020; Nobrega et al., 2021). Adicionalmente, tanto el tratamiento antimicrobiano y la efectividad de la vacuna J5 contra coliformes, presentan una baja efectividad para casos de IMI producidos por *K. pneumoniae* (Roberson et al., 2004; Paulin-Curlee et al., 2008; Schukken et al., 2012). Considerando lo anterior, pese a la transitoriedad de los cursos de IMI por *K. pneumoniae*, se describe que cuadros clínicos que no son sometidos a terapia antimicrobiana pueden convertirse en cuadros de infección recurrentes (Du Preez, 2000; Oliveira et al., 2013; Fuenzalida & Ruegg, 2020). Junto con esto, la recurrencia de los cuadros infecciosos producidos por *K. pneumoniae* pueden conllevar a una mayor tasa de eliminación dentro del rebaño y un mayor volumen de leche descartada (Roberson et al., 2004; Gröhn et al., 2005; Riekerink et al., 2008; Schukken et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Respecto de la epidemiología de *K. pneumoniae* en cuadros de IMI, la identificación de posibles fuentes y reservorios dentro de las granjas lecheras

ejerce un rol importante para permitir establecer estrategias de control y prevención efectivas para este patógeno (Zadoks et al., 2011; Schukken et al., 2012; Klaas & Zadoks, 2018). Junto a lo anterior, una estrategia básica para la prevención de IMI por *K. pneumoniae* consiste en limitar el contacto directo entre las fuentes de esta bacteria y la punta del pezón de vacas susceptibles (Sampimon et al., 2006; Schukken et al., 2012).

### **Fuentes de *Klebsiella* spp. en granjas lecheras**

Respecto a las principales fuentes de *K. pneumoniae* en las granjas lecheras, éstas se pueden categorizar según su origen en fuentes internas y externas (Zadoks et al., 2011). Dentro de esta primera categoría, se describen fuentes como el tracto gastrointestinal, la piel, la mucosa y las heces, incluso de vacas adultas sanas, debido a que contienen una gran variedad de especies de *Klebsiella* (Munoz & Zadoks, 2007; Munoz et al., 2007; Zadoks et al., 2011). Adicionalmente en términos de fuentes externas, tanto el agua potable, el alimento almacenado y el material para el relleno de camas, se describen de manera inicial como posibles fuentes de *K. pneumoniae* (Nonnecke y Newbould, 1984; Silva y Costa 2001; Munoz et al., 2007, 2008; Zadoks et al., 2011). Sin embargo, debido a la dinámica de transmisión y eliminación del patógeno bacteriano a través de las heces animales, la ubicuidad de *K. pneumoniae* puede convertir diferentes estructuras dentro de las granjas lecheras en fuentes de esta bacteria (Munoz et al., 2008; Zadoks et al., 2011;

Schukken et al., 2012). Por lo anterior, tanto el material de cama contaminado, el equipo de ordeño, el piso de pasillos y galpones de estabulación, salpicaduras de heces, agua y/o leche, pueden considerarse también como fuentes de *K. pneumoniae* (Schukken et al., 2012). En el mismo sentido, respecto de la epidemiología de *K. pneumoniae*, se describen también: rutas de transmisión oro fecales, contacto directo entre vacas, así como también los puntos fuente, mencionados anteriormente, que actúan como reservorios de esta bacteria en el ambiente interno de las granjas lecheras (Munoz et al., 2007; Zadoks et al., 2011). Considerando lo descrito anteriormente, en casos de brotes de IMI por *K. pneumoniae* el principal desafío recae en la identificación certera y oportuna de las fuentes y/o reservorios involucrados dentro de la granja lechera (Zadoks et al., 2011).

### **Presencia de biopelículas bacterianas en granjas lecheras**

Por otra parte, Latorre et al. (2010) describe por primera vez la presencia de biopelículas en equipos de ordeño y su rol como fuente y/o reservorio de patógenos mamarios dentro de las granjas lecheras. Por otra parte, una biopelícula, en consenso, se define como: comunidades microbianas adheridas de manera permanente a una superficie orgánica o inorgánica, cubiertas su vez, por una matriz polimérica extracelular autoproducida (Latorre et al., 2011; Wilson et al., 2017). Importantemente, la función de esta matriz polimérica extracelular consiste en proporcionar protección, estabilidad

estructural y una adecuada disponibilidad de nutrientes para los distintos microorganismos que habitan y se desarrollan al interior de la biopelícula (Flemming & Wingender, 2010). Más aún, la matriz polimérica extracelular también otorga mayor resistencia a antimicrobianos y a diversos factores estresantes exógenos (Latorre et al., 2011; Wilson et al., 2017; Brindhadevi et al., 2020; Wang et al., 2020). Por consiguiente, la presencia de biopelículas maduras dentro del equipo de ordeño es capaz de generar desprendimientos de células planctónicas que pueden a su vez propagarse, colonizar e infectar sitios lejanos a la biopelícula fuente (Chao et al., 2014; Guerra et al., 2022). Por otra parte, cabe destacar que la presencia de biopelículas en granjas lecheras ha sido reportada con mayor frecuencia durante la última década, principalmente asociada a equipos de ordeño con protocolos de higiene y manejo deficientes (Latorre et al., 2010, 2011, 2020; Latorre y Munoz, 2015, 2019; Pacha et al., 2021). En este sentido, existen diferentes estudios que describen el rol activo de las biopelículas y la capacidad de adherencia de múltiples especies bacterianas de importancia para la salud mamaria y la salud pública (Latorre et al., 2010, 2011, 2020; Pacha et al., 2021). Dentro de las especies bacterianas involucradas en la formación de biopelículas se ha reportado principalmente la presencia de *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y *K. pneumoniae* (Latorre et al., 2010, 2022). Particularmente, se describe la presencia de *K. pneumoniae* en biopelículas adheridas a equipos de ordeño en granjas lecheras (Latorre et al., 2022; Gonzalez-Cordova et al., 2024). En atención a

lo anterior, la formación de biopelículas en equipos de ordeño puede también considerarse como fuente epidemiológica de patógenos bacterianos que afectan la salud y calidad de leche en rebaños lecheros (Latorre et al., 2011). En complemento, a nivel mundial en medicina humana, *K. pneumoniae* es considerado uno de los principales agentes causantes de infecciones intrahospitalarias (Martin & Bachman, 2018; Wang et al., 2020). Junto a esto, la formación de biopelículas es uno de los mecanismos propuestos que explicaría la persistencia de *K. pneumoniae* en infecciones nosocomiales (Martin & Bachman, 2018; Massé et al., 2020; Wang et al., 2020; Wyres et al., 2020). Por otra parte, en salud animal, diferentes estudios in vitro han descrito la habilidad de formación de biopelículas de cepas de *K. pneumoniae* provenientes de granjas lecheras (Schönborn et al., 2017; Massé et al., 2020; Gonzalez-Cordova et al., 2024). El primero de estos estudios, corresponde al realizado por Schönborn et al. (2017), en donde describen que el 90% de las cepas de *Klebsiella*, evaluadas in vitro mediante el método de tubo, presentan formación de biopelículas. Sin embargo, respecto del estudio anterior, es necesario mencionar que el método de tubo no es frecuentemente considerado como ensayo de consenso para evaluar la habilidad de formación de biopelículas bacterianas. Pese a este cuestionamiento, el estudio de Schönborn et al. (2017) es considerado como el primer reporte en materia de formación de biopelículas in vitro en cepas de *Klebsiella* procedentes de granjas lecheras. Por otro lado, el segundo estudio reportado corresponde al realizado por Massé et al., (2020), quienes describen que la totalidad de las

cepas de *Klebsiella* evaluadas por estos autores tienen la capacidad in vitro de producir biopelículas. En este punto cabe destacar, que ambos estudios utilizaron cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de cuartos mamarios con cursos de infección clínico. No obstante, a diferencia del estudio realizado por Schönborn et al. (2017), la evaluación de formación de biopelículas reportada por Massé fue realizada utilizando el procedimiento de ensayo en placa de microtitulación (Microtiter Plate Assay; MPA). Más aún, utilizando métodos homólogos a los de Massé et al. (2020), Gonzalez-Cordova et al., (2024) también reportan la formación in vitro de biopelículas producida por cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas tanto desde leche de estanque, como de biopelículas adheridas a equipos de ordeño. Por otra parte, respecto del cuadro clínico producido por las distintas cepas evaluadas, Massé et al. (2020) describen que no se observaron asociaciones significativas entre la formación de biopelículas entre las diversas cepas de *Klebsiella* y la severidad de los cuadros de IMI. Sumado a lo anterior, pero en otras especies bacterianas, Fidelis et al. (2024) también reportan que no hay una correlación directa entre la habilidad de formación de biopelículas de cepas de *S. aureus* y *S. uberis*, y la patogénesis expresada en las IMI subyacentes. Sin embargo, Latorre et al. (2020), reportan un rol activo en salud mamaria que poseen las cepas viables de *S. aureus* presentes en biopelículas adheridas a equipos de ordeño y el rol de reservorio que tienen estas biopelículas. Además de lo descrito anteriormente, la capacidad de formación de biopelículas en cepas de *S. aureus* sigue siendo reconocida como una característica crucial en la

patogénesis de esta bacteria en el curso de IMI (Latorre et al., 2020; Fidelis et al., 2024). Considerando estos últimos antecedentes y en contraste con los estudios existentes para *S. aureus*, aún no se reportan investigaciones que describan la asociación epidemiológica entre la habilidad de formación de biopelículas en *K. pneumoniae* y su participación como agente causal de IMI. Existiendo solo estudios que evalúan la adherencia de cepas de *K. pneumoniae* de aislados provenientes de biopelículas en equipos de ordeño y aislados provenientes de leche de tanque, y otro estudio donde no se contrasta el perfil de adherencia de aislados clínicos con aquellos provenientes de otras fuentes y reservorios.

Por tanto, la siguiente investigación tiene como finalidad evaluar la habilidad de formación de biopelículas de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de leche de cuartos con IMI de distintos planteles lecheros, y comparar estas habilidades de adherencia con aislados provenientes de leche de estanque y de adherencias a superficies de equipos de ordeño.

**Hipótesis:** Aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de cuadros de infección intramamaria poseen una alta capacidad de formación de adherencias *in vitro* en comparación con cepas aisladas desde leche de tanque y biopelículas nativas en equipos de ordeño.

## **II. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la habilidad de formación de adherencias in vitro de cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas desde cuartos con infección intramamaria, leche de estanque y biopelículas nativas en granjas lecheras de Chile

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la frecuencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas desde cuartos con infección intramamaria a través del uso de técnicas microbiológicas, genómicas y proteómicas.
2. Caracterizar y evaluar la diversidad genética de cepas de *Klebsiella pneumoniae* mediante la técnica ERIC RAPD-PCR con alto poder de discriminación.

3. Evaluar la habilidad de formación de adherencias *in vitro* de cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de muestras de leche de cuartos con infección intramamaria, de leche de estanque y de adherencias a superficies de equipo de ordeño utilizando la técnica *Microtiter Plate Assay*.
  
4. Comparar los perfiles de habilidad de formación de adherencias *in vitro* producida por cepas de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de muestras de leche de cuartos con infección intramamaria, de leche de estanque y de adherencias a superficies de equipo de ordeño dentro de granjas lecheras.

### **III. MATERIALES Y METODO**

#### **Recolección de muestras y selección de aislados bacterianos**

Para el presente estudio se utilizó un set de 56 aislados bacterianos obtenidos desde muestras de leche de cuartos bovinos con infección intramamaria (IMI) subyacente. El set de 56 aislados bacterianos utilizados en el presente estudio fue seleccionado de un total de 100 muestras de leche colectadas en el marco de un muestreo dirigido en la región de Los Ríos y Los Lagos durante el período comprendido entre octubre 2023 a junio de 2024. Este muestreo fue realizado en el marco de un proyecto colaborativo que incluía un muestreo y determinación de frecuencia de IMI producidas por patógenos putativamente ambientales. El número de vacas muestreadas dependió principalmente del número de casos que estuvieran dentro de los criterios de inclusión determinados por el proyecto al momento de las visitas a las granjas. Con respecto a los criterios de inclusión utilizados para el muestreo microbiológico, correspondieron a casos de mastitis clínica y subclínica de rebaños lecheros dentro de 10 granjas diferentes de la región de Los Ríos y de la región de Los Lagos. Junto a esto, se consideraron cuadros de mastitis clínica leves, moderados y severos, mientras que, para mastitis subclínica, se consideraron vacas con recuentos celulares somáticos mayores a 200.000 cél/mL (multíparas) y 100.000 cél/mL (primíparas). Luego de un aislamiento primario, los aislados putativamente ambientales fueron preseleccionados y

categorizados morfológicamente como posibles coliformes (Tabla 1.). Posteriormente, los aislados categorizados potencialmente como bacterias coliformes fueron enviados y recepcionados por nuestro equipo de calidad de leche de la Universidad de Concepción, para su posterior identificación, selección y evaluación para el presente estudio científico. Junto con lo anterior, la identificación bacteriana inicial para el set de 56 aislados bacterianos fue realizada según lo descrito por Munoz et al. (2006) basado en los procedimientos del Quality Milk Production Services (QMPS), Cornell University, Ithaca, NY, for bacteriological culture. En primer lugar, los aislados correspondientes al stock titulado “Brandon González Córdova” (BGC Isolates) fueron removidos brevemente desde su almacenamiento a -80°C (HAIER Biomedical, Qingdao, P.R, China) del Laboratorio de Investigación en Mastitis y Calidad de Leche (LIMCAL, Universidad de Concepción, Chillán, Chile). Luego se seleccionaron pequeños lotes de 5 viales para poder trabajar al mismo tiempo en un mini-cooler de mesón a -20 °C y el resto de los aislados fueron devueltos inmediatamente al ultrafreezer de -80 °C para evitar la sobreexposición a temperatura ambiental. Junto a lo anterior y bajo condiciones asépticas, se realizó la apertura de los viales Microbank (Pro-Lab Diagnostics, Round Rock, TX) y se removieron las perlas utilizando asas de inoculación de 10 µL para sembrar directamente cada perla con el aislado respectivo a una placa de agar MacConkey (MacConkey Agar No. 3, CM0115, Oxoid Ltd.). Una vez sembradas las 55 placas con su respectivo aislado (BGC isolates), éstas se incubaron a 37° C overnight (20 h aproximadamente) en

una estufa de incubación (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Luego de su incubación, se procedió a evaluar visualmente cada una de las placas en busca de colonias de tipo *Klebsiella* spp. siguiendo el criterio descrito por Muñoz et al. (2006). Para la confirmación microbiológica de los potenciales aislados de *Klebsiella* spp. se realizó el “test de citrato” y “test de motilidad” para cada uno de los respectivos aislados, según describe el Consejo Nacional de la Mastitis (National Mastitis Council, 1999), con leves modificaciones (Tabla 2.). Para poder realizar tanto la prueba de citrato, como la prueba de motilidad, los 56 aislados bacterianos volvieron a sembrarse en una segunda placa de agar MacConkey y se incubaron a 37° C overnight (20 h aproximadamente). Una vez obtenidos cultivos puros de los respectivos aislados, utilizando un asa de inoculación de 1 µL se procedió a inocular los slants (viales de agar biselado de Citrato de Simmons (Simmons citrate agar, Oxoid Ltd.). En paralelo, utilizando agujas de cultivo estériles también se inocularán los slants de medio “Motilidad-Indol-Ornitina” (M.I.O, Difco, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD). Luego se incubarán los viales de Citrato de Simmons y de Motilidad-Indol-Ornitina a 37° C durante 16 h aproximadamente. En el escenario de que de la prueba de citrato no fuera concluyente, se procedió a extender la incubación hasta las 24 h y se consideraron resultados positivos a *Klebsiella* spp. cuando el medio de color verde se tornó de color azul. Para esta prueba de citrato se utilizaron *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 como control positivo y *E. coli* ATCC 25922 como control negativo. Por otra parte, para la prueba de motilidad se

utilizaron *E. coli* ATCC 25922 como control positivo y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 como control negativo. Se consideraron resultados positivos de esta prueba cuando el medio de motilidad se enturbió completamente. Además, la lectura de la reacción de motilidad fue realizada utilizando una prueba de “*Indol spot test*” (BBL DMACA *indole reagent droppers*, Becton, Dickinson and Co.), según describe Muñoz et al. (2006). Los aislados bacterianos se consideraron del género *Klebsiella* si resultaron ser “Citrato positivos” y “Motilidad negativos”. Junto con esto, para la identificación a nivel de especies de *Klebsiella* los resultados tanto de “Indol positivos”, como de “Indol negativos”, fueron considerados de la especie *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, respectivamente (Tabla 2.). Adicionalmente a esto, los aislados confirmados como positivos a *Klebsiella* spp. fueron identificados a nivel de especie mediante la técnica “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry” (MALDI-TOF MS), siguiendo las pautas descritas por Hülland et al. (2018). Por otro lado, como contraparte del análisis comparativo de habilidad de formación de adherencias *in vitro*, también se incluyó un set de 7 aislados de *K. pneumoniae* seleccionados, evaluados y descritos previamente en el estudio de Gonzalez-Cordova et al. (2024). El origen de estos 7 aislados de *K. pneumoniae* corresponde tanto a muestras de biopelículas en superficies de equipos de ordeño, como muestras de leche de tanque en 5 granjas lecheras de la región de Ñuble, respectivamente. Además, estos aislados de *K. pneumoniae* también fueron identificados a nivel de especie mediante la técnica MALDI-TOF MS, siguiendo los procedimientos

descritos por Hlland et al. (2018). Considerando un score de identificación  $\geq$  2.0 según las instrucciones de VITEK® MS (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). Por otro lado, la habilidad de formación de adherencia in vitro de estos aislados de *K. pneumoniae* fue evaluada mediante la técnica de ensayo en placas de microtitulación (*Microtiter Plate Assay*; MPA), según lo descrito por Latorre et al. (2011).

**Tabla 1.** Criterios de caracterización morfológica de las colonias de coliformes aisladas en agar Columbia-Sangre y agar MacConkey de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el periodo de octubre del 2023 a junio del 2024, según describe el Consejo Nacional de la Mastitis (NMC, 2017), con modificaciones.

<b>Especie Coliforme</b>	<b>Morfología bacteriana en Agar Columbia Sangre</b>	<b>Morfología bacteriana en Agar MacConkey</b>
<i>Escherichia coli</i>	Colonia bacteriana de 2-4 mm, de color gris, húmeda, brillante y con forma redondeada. Pueden presentar hemólisis en < 15% de los cultivos.	Colonia bacteriana de 2-4 mm, de color rosado intenso-rojizo, de elevación plana, seca, textura cremosa y borde aserrado (forma pseudo estrellada o “flor de cerezo” <sup>1</sup> ). Presenta halo rosado en agar PDSB <sup>2</sup> .
<i>Klebsiella</i> spp.	Colonia bacteriana de 2-5 mm, de color gris, húmeda, brillante, de textura mucoide y borde definido.	Colonia bacteriana de 2-4 mm, de color rosado-amarillo, de elevación convexa (forma de domo), húmeda, brillante, textura mucoide y de borde definido. Sin presencia de halo rosado por PDSB <sup>2</sup> .
<i>Enterobacter</i> spp.	Colonia bacteriana de 3-5 mm, de color gris, húmeda, de textura mucoide y borde definido.	Colonia bacteriana de 2-4 mm, de color rosado claro-traslúcido, de elevación plana, seca, textura mucosa con leve coalescencia. Sin presencia de halo rosado por PDSB <sup>2</sup> .

<sup>1</sup>Definición propuesta del autor para referirse de manera descriptiva a la expresión fenotípica característica de *Escherichia coli* en agar MacConkey, definida principalmente por el color de las colonias y la forma aserrada de sus bordes. <sup>2</sup>Precipitado de sales biliares producido por *Escherichia coli* en agar MacConkey, el cual se manifiesta en forma de halo rosado oscuro debajo de las colonias bacterianas.

**Tabla 2.** Criterios de interpretación de perfiles bioquímicos y pruebas de motilidad para el diagnóstico presuntivo de especies bacterianas coliformes de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el periodo de octubre del 2023 a junio del 2024, según describe el Consejo Nacional de la Mastitis (NMC, 2017), con modificaciones.

<b>Especie Coliforme</b>	<b>Prueba de Motilidad</b>	<b>Prueba de Citrato</b>	<b>Prueba de spot indole</b>
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+
<i>Enterobacter</i> spp.	+	+	-
S/C <sup>1</sup>	-	-	-

<sup>1</sup>Sin clasificación, corresponden a especies bacterianas que presentan resultados negativos en las tres pruebas respectivas y no pueden categorizarse en ninguna de las especies de coliformes evaluadas. +: resultado positivo a la prueba; -: resultado negativo a la prueba.

## **Extracción de ADN de aislados para caracterización molecular**

La extracción de ADN para caracterización molecular de *Klebsiella* spp. se llevó a cabo siguiendo las pautas descritas por Muñoz et al. (2007), basadas en los procedimientos del *Quality Milk Production Services* (QMPS), Cornell University, Ithaca, NY, con leves modificaciones. En primer lugar, se seleccionaron los lisados a preparar dependiendo del número de aislados que se hayan identificado positivamente como *K. pneumoniae*. Estos aislados se volvieron a recuperar desde el stock -80° C siguiendo las pautas descritas por Muñoz et al. (2006) basado en los procedimientos del *Quality Milk Production Services* (QMPS), Cornell University, Ithaca, NY, *for bacteriological culture*.

Posteriormente utilizando asas de inoculación de 1 µL se seleccionaron las colonias aisladas de los respectivos aislados y se sembraron en placas TSA (BD, Sparks, MD, USA) Luego se incubaron las placas sembradas a 37° durante 24 h y se evaluó el crecimiento en las placas para asegurar la obtención de un cultivo puro. Además, se incluyeron los controles positivos y negativos, los cuales corresponden a *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *P. aeruginosa* ATCC 15442, respectivamente. Adicionalmente, se incluyeron en el procedimiento de extracción un control de medio correspondiente a caldo BHI sin inocular. Junto a esto, se utilizaron tubos de cultivo con 3 mL de caldo BHI (BD, Sparks, MD, USA) rotulados con iniciales, fecha, lote e identificación del aislado para inocular las colonias cultivadas anteriormente; se flamearon los tubos después de abrir y antes de cerrar su tapa. Los tubos inoculados se

incubaron a 37 °C por 4 h (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), y se evaluó el desarrollo bacteriano mediante la turbidez del medio y verificando además la transparencia del control negativo sin inóculo bacteriano. Luego se procedió a traspasar 95 µL de caldo BHI de cada aislado respectivo y 95 µL de caldo BHI de los controles incubados a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, rotulados previamente. Los tubos de microcentrífuga con los 95 µL de caldo bacteriano fueron centrifugados a 13.000 r.p.m. durante 10 min (Spectrafuge 24D Labnet, Edison, NJ, USA). Luego se retiró el sobrenadante de cada tubo y el pellet fue re suspendido agregando 95 µL de 1X TE buffer Molecular grade 10 mM tris-HCl: 1 mM EDTA: pH 8.0 (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Posteriormente, los tubos re suspendidos fueron sometidos a 100°C por 10 min en un baño seco digital (AccuBlock® Labnet, Edison, NJ, USA) y se dejaron enfriar durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se les aplicó a los tubos re suspendidos una rápida centrifugación a 13.000 r.p.m. y luego fueron refrigerados a -20 °C para la mantención de los productos de DNA correspondientes a cada uno de los aislados.

## Tipificación molecular de aislados por RAPD-PCR

La tipificación de las cepas fue realizada a través de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR), siguiendo las pautas descritas por Muñoz et al. (2007). Para este procedimiento se utilizaron los extractos de ADN de las cepas de *K. pneumoniae* obtenidos con anterioridad, los cuales fueron almacenados a -20° C en el congelador. Los primers a utilizar correspondieron a “ERIC-2/ERIC-1026” (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' y 5'-TAC ATTGAGGACCCCTAAGTG-3', respectivamente). Además, para la configuración del termociclador (Labnet, Edison, NJ, USA) se utilizaron las condiciones de ciclos descritas por Vogel et al. (1999). En primer lugar, se procedió a realizar la preparación del mix de PCR, en donde fue utilizada GoTaq Green G2 Master mix® (Promega Corporation, Madison, WI, USA), dH<sub>2</sub>O y el ADN extraído correspondiente a cada una de las cepas de *K. pneumoniae* seleccionadas. Previo a la realización de la amplificación de los productos de PCR en el termociclador, también se agregaron los diferentes controles, una cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 como control positivo, una cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 como control negativo, un control negativo sin inóculo y un control negativo de agua con calidad molecular. Posteriormente, para realizar la electroforesis de los productos amplificados, fue utilizado un gel de agarosa de grado analítico al 1.5% (Fermelo Biotec, Providencia, SA, Chile) en conjunto a una solución de corrida correspondiente a TBE buffer 1X Molecular grade 89 mM Tris-borato: 89 mM ácido bórico: 2 mM EDTA: pH 8.3 (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Además, dentro de los pocillos del gel fue agregada en ambos extremos una escalera molecular de 100bp DNA Ladder/ Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Los productos de PCR se cargarán en 16 pocillos de 1.5 mm y se agregará TBE buffer 0.5X *Molecular grade* 44,5 mM Tris-borato: 44,5 mM ácido bórico: 1 mM EDTA: pH 8.3 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) junto al gel dentro en la cámara. Posteriormente, se procederá a correr el gel de agarosa cargado con los productos durante 2 h a 95 V utilizando una cámara de electroforesis horizontal (Labnet, Edison, NJ, USA). Luego de realizada la corrida de electroforesis y la migración de los productos de PCR, se preparó una solución de tinción de 200 mL, en donde fue agregada agua destilada estéril, NaCl y una tinción GelRed® a 3000x (Biotium Inc., Fremont, CA, USA). Finalmente, una vez teñido durante 1 h, el gel fue visualizado a través de un transiluminador ultravioleta ENDURO™ GDS (Labnet, Edison, NJ, USA), utilizando el software GDSLAB, en el Laboratorio de “Zoología y Vida Silvestre”, Universidad de Concepción.

## **Ensayos en placas de microtitulación (Microtiter Plate Assay; MPA)**

Se realizaron ensayos en placas de microtitulación para determinar cualitativamente la habilidad de adherencia *in vitro* que presenta cada uno de los aislados de *K. pneumoniae*, siguiendo el protocolo descrito por Latorre et al. (2011), con modificaciones. En primer lugar, se volvieron a recuperar una vez más los aislados seleccionados de *K. pneumoniae* del stock -80°C, siguiendo las pautas del Quality Milk Production Services (QMPS), Cornell University, Ithaca, NY, *for bacteriological culture*, utilizadas anteriormente para el análisis microbiológico y caracterización molecular según lo descrito por Muñoz et al. (2006). Luego de esto, se sembraron nuevamente las placas con los aislados de *K. pneumoniae* seleccionados y fueron incubados a 37° C overnight. Al día siguiente, se removieron las placas de incubación y se verificó el crecimiento y la pureza de los cultivos. Junto a esto, fueron seleccionadas las colonias aisladas y utilizando un asa o loopful 1 µL de cada cultivo, se inocularon 10 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) (BD, Sparks, MD, USA), los cuales se incubaron a 37°C por 18 h (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Además, se incluyeron: las cepas *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *K. pneumoniae* BGC-097 (control interno altamente formador de adherencias) como controles positivos, una cepa *K. pneumoniae* BGC-094 (control interno con baja formación de adherencias) como control negativo y un control de análisis negativo del caldo TSB sin inóculo. Luego de remover los cultivos TSB de incubación, pasadas las 18 h, se transfirieron 100 µL de cada TSB cultivado a 10 mL nuevos de TSB (BD, Sparks, MD, USA), los tubos

se mezclarán en “vortex” de manera homogénea (10 s cada uno). Posteriormente, utilizando una micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$  y puntas con filtro estériles de 1000  $\mu\text{L}$ , se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada cultivo de TSB diluido a 8 pocillos de una microplaca estéril de Poliestireno (PE) de 96 pocillos con fondo plano (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Una vez llenados todos los pocillos de la placa (incluyendo el control blanco), cada microplaca fue cubierta por una tapa de poliestireno estéril (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) y fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Pasado el período de incubación, los cultivos en microplaca fueron removidos de la estufa y se documentaron los ensayos con una fotografía de placa completa. Posteriormente, se removieron los cultivos de cada uno de los pocillos de la microplaca utilizando una micropipeta multicanal con puntas estériles de 200  $\mu\text{L}$ . Una vez vaciados los pocillos, estos fueron lavados 3 veces con 150  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y luego se dejaron secar al aire durante 45 min. Luego de que las microplacas se encontraran secas, se procedió a teñir cada pocillo con 150  $\mu\text{L}$  de cristal violeta al 1% (Merck, Darmstadt, Germany) y se dejó actuar la tinción durante 45 min. Una vez pasado el tiempo de tinción, se removieron los 150  $\mu\text{L}$  de cristal violeta de cada pocillo y se procedió a lavar 3 veces utilizando 150  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Una vez retirada la tinción y lavados los pocillos, la microplaca fue invertida y golpeada suavemente con una toalla de papel para remover el remanente de agua, y fueron secadas al aire. En este punto fue documentado nuevamente el resultado del ensayo con una fotografía de placa completa y las microplacas fueron almacenadas hasta

el respectivo ensayo cuantitativo. En este punto cabe destacar, que todas las placas del ensayo se prepararon por duplicado y el experimento general se realizó por triplicado. Por otra parte, para el ensayo cuantitativo, primeramente, se agregaron 150  $\mu$ L de etanol al 95% (Merck, Darmstadt, Germany) a cada uno de los pocillos para solubilizar la adherencia bacteriana teñida producida por cada aislado. Luego de la re solubilización, las microplacas fueron cubiertas con sus respectivas tapas de poliestireno y se incubaron a 4°C durante 30 min. Una vez retiradas las microplacas de su incubación, se mezclaron brevemente los contenidos de cada pocillo pipeteando cuidadosamente 10 veces cada uno de ellos. Posteriormente se transfirieron 100  $\mu$ L de la solución tinción/etanol solubilizada a una nueva microplaca de PE de 96 pocillos con fondo plano. Estas nuevas microplacas que contuvieron la mezcla de tinción/etanol solubilizada, fueron sometidas a la evaluación y lectura de la densidad óptica (OD) a 590 nm a través de un espectrofotómetro de microplacas EPOCH BioTek™ (BioTek, Winooski, VE, USA), utilizando el software Gen5™ en el “Laboratorio de Biotecnología Animal” de la Universidad de Concepción.

## **Análisis de los resultados**

Los resultados generales obtenidos en este estudio fueron analizados utilizando parámetros de estadística descriptiva. La diversidad de los aislados se evaluó utilizando el índice de diversidad de Simpson (SID; Simpson's Index of Diversity) según describen Grundmann et al. (2001) y Muñoz et al. (2007), considerando un rango de valores desde 0 (no existe diversidad) a 1 (extremadamente diverso) (Hunter y Gaston, 1988). Respecto a los resultados de la evaluación, diferencias con valores de p menores o igual a 0,05 fueron consideradas significativas. Junto a esto, la categorización de relación genética y epidemiológica de los patrones de banda de cada aislado obtenidos mediante RAPD-PCR, fue realizada según describe Tenover et al. (1995), en conjunto con la lectura, visualización y criterio de diferenciación de dos evaluadores independientes. Por otra parte, para el análisis de resultados de los ensayos placa de microtitulación se siguieron las pautas descritas por Stepanovic et al. (2000), con modificaciones basadas en el método estandarizado propuesto por Muñoz et al. (2024). En primer lugar, una vez obtenidos los resultados de las lecturas, se calcularán los promedios de las OD 590 nm de todas las repeticiones del experimento. Luego, el promedio del control blanco de cada placa fue restado al promedio de cada cepa de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* evaluada en las placas respectivas. Todas las cepas se clasificarán en las siguientes categorías según su habilidad de formación de adherencia *in vitro*: baja, media, media alta y alta, respectivamente. Esta categorización fue realizada evaluando la relación de

adherencia (RA) correspondiente entre el OD promedio de cada cepa, con respecto del OD promedio del control de baja formación de adherencia *in vitro*. Luego de calculada la RA respectiva para cada una de las cepas, esta RA promedio se corregirá por el logaritmo natural [ $\text{Log}_e(x)$ ], permitiendo así, poder tener un valor promedio que se ajuste de mejor manera a la distribución normal del comportamiento de formación de adherencias bacterianas en el medio ambiente nativo y a los factores involucrados en su desarrollo.

$$\ln(x)$$

$$\ln(x) = \log_e(x)$$

$$\ln(x) = y \iff e^y = x$$

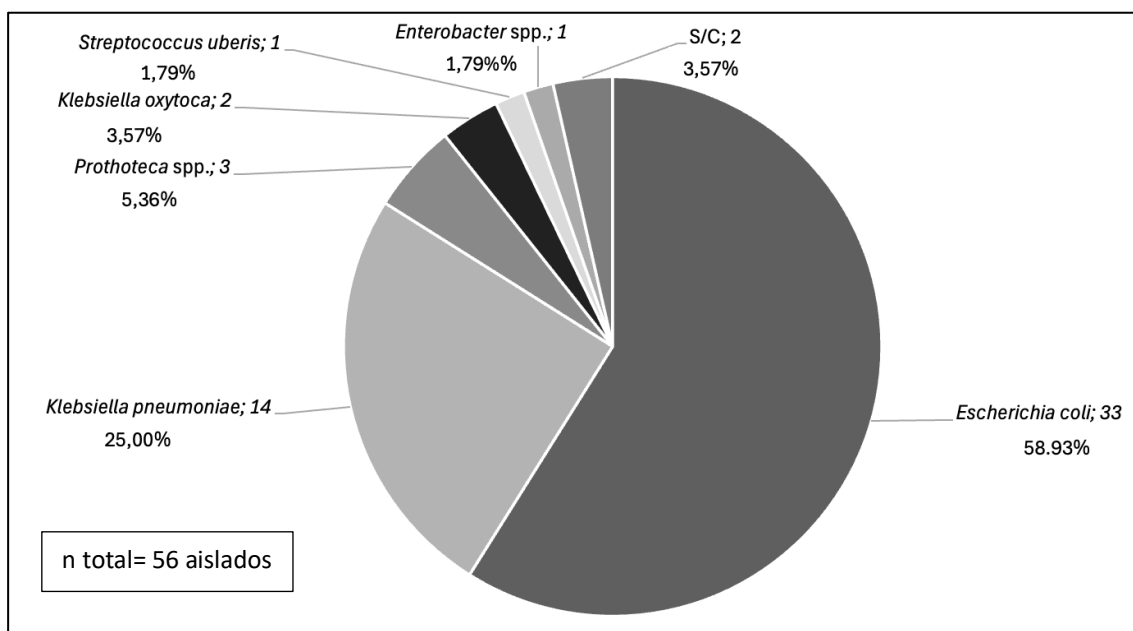
El modelo matemático utilizado en el presente estudio para poder calcular la habilidad de adherencia bacteriana *in vitro* corresponde a la propuesta descrita por Munoz et al. (2024) presentada en la “*International Dairy Federation World Dairy Summit, 2024*”, Paris, Francia.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación microbiológica de los aislados bacterianos

En primer lugar, luego de la evaluación microbiológica del set de 56 aislados identificados a nivel de especies utilizando técnicas y criterios de microbiología convencional de consenso internacional para identificación de bacterias coliformes (Tabla 1. y Tabla 2.), se pudieron obtener los siguientes resultados en términos de frecuencia y distribución relativa de especies bacterianas. La gran mayoría de los aislados analizados primariamente en este estudio correspondió a *E. coli* y a *K. pneumoniae*, con un 58,93% de las muestras (n=33) y un 25,00% (n=14), respectivamente. En un segundo plano, podemos encontrar a *Prototheca* spp., a *K. oxytoca*, *S. uberis* y *Enterobacter* spp., con 5,36% (n=3), 3,57% (n=2), 1,79% (n=1) y 1,79% (n=1), respectivamente (Fig. 1.). Finalmente, dentro de este primer análisis, hubo un 3,57% de las muestras (n=2) el cual no se pudo clasificar por falta de precisión en la metodología empleada para identificación convencional (Fig. 1.). En términos generales dentro esta primera evaluación, se lograron observar algunos resultados esperados en término frecuencia de aislamiento de ciertas especies bacterianas provenientes de casos de IMI en rebaños lecheros. Para el caso de bacterias del grupo coliformes aisladas de IMI, los resultados iniciales conciben con lo reportado en estudios de diferentes países, en donde se mantiene una predominancia de *E. coli*, junto con *K. pneumoniae* en segundo lugar (Bradley et al., 2007; Riekerink et al., 2008; Oliveira et al.,

2013). Sin embargo, uno de los resultados que sorprendió en este punto, fue la frecuencia de *Prototheca* spp., considerando que el método de aislamiento estaba orientado para preselección e identificación de especies bacterianas coliformes (Tabla 1. y Tabla 2.). El anterior comportamiento sigue la tendencia de que las IMI producidas por *Prototheca* spp., son cada vez más frecuentes tanto en nuestro país, como en otras partes del mundo (Gonçalves et al., 2015; Rodriguez et al., 2025). Por otro lado, tanto *K. oxytoca*, como *Enterobacter* spp., eran especies bacterianas esperadas en la evaluación primaria de las muestras preseleccionadas de bacterias coliformes, y conciben con lo descrito en términos de prevalencia en otros estudios (Pirner et al., 2024). Por último, tanto para el aislado identificado como posible *S. uberis*, como para los aislados bacterianos sin clasificar (S/C), al no ser objetivos del presente estudio por no pertenecer al grupo de coliformes, solamente se reportaron de esa manera como diagnósticos presuntivos.



**Figura 1.** Frecuencia y distribución relativa porcentual inicial (n=56) de especies bacterianas identificadas mediante técnicas de microbiología convencional de consenso internacional de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el período de octubre del 2023 a junio del 2024.

Luego de la evaluación e identificación inicial de especies coliformes, fue revisada detalladamente la información del “background” epidemiológico de los posibles aislados de *K. pneumoniae*. En base a la disponibilidad completa de la información epidemiológica para trazabilidad de cada una de las muestras, se seleccionaron de manera estratégica 11 de los 14 aislados presuntivos de *K. pneumoniae* para ratificación a nivel de especie mediante la técnica proteómica MALDI-TOF MS (Tabla 3.) Los 11 aislados seleccionados presentaban fecha del evento, tipo de evento, detalles del animal y la granja.

**Tabla 3.** Selección de aislados presuntivos de *Klebsiella pneumoniae* identificados mediante microbiología convencional para ratificación a nivel de especie mediante técnica MALDI-TOF MS, según describe (Hylland et al., 2018). Considerando un score de identificación  $\geq 2.0$  según las instrucciones de VITEK® MS (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France).

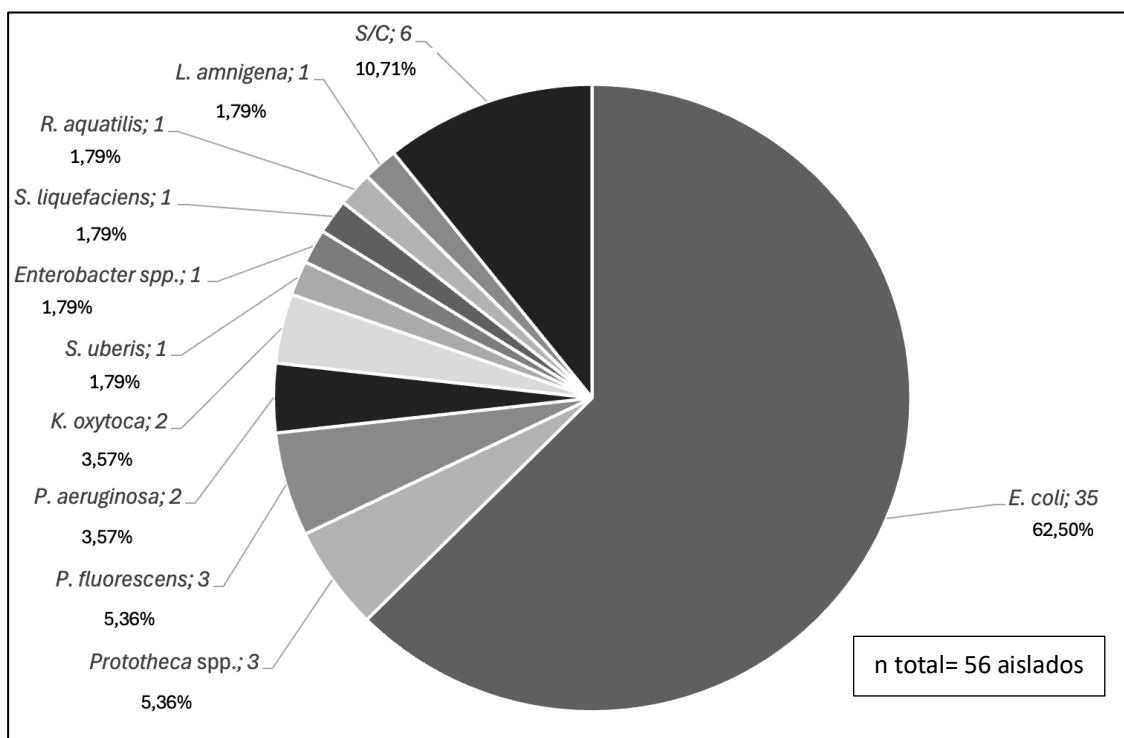
Cepa	Origen	Granja	Diagnóstico presuntivo	Ratificación vía MALDI-TOF <sup>3</sup>
B04	IMI <sup>1</sup>	2	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B05	IMI <sup>1</sup>	2	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
B06	IMI <sup>1</sup>	S/I <sup>2</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
B07	IMI <sup>1</sup>	1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
B10	IMI <sup>1</sup>	1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
B12	IMI <sup>1</sup>	1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
B42	IMI <sup>1</sup>	S/I <sup>2</sup>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
B53	IMI <sup>1</sup>	6	<i>K. pneumoniae</i>	S/I <sup>2</sup>
B62	IMI <sup>1</sup>	9	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Ranheilla aquatilis</i>
B69	IMI <sup>1</sup>	10	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>
B71	IMI <sup>1</sup>	11	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

<sup>1</sup>IMI: infección intramamaria. <sup>2</sup>Sin identificación. <sup>3</sup>MALDI TOF MS: técnica proteómica de identificación de especies bacteriana, definida como “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry”.

Una vez obtenidos los resultados de la ratificación por MALDI-TOF, pudimos observar que nuestros 11 aislados presuntivos de *K. pneumoniae* y candidatos para las siguientes evaluaciones de tipificación genética y formación de adherencia *in vitro*, finalmente correspondían a otras especies bacterianas (Tabla 3.). Luego de obtenidos los resultados de este nuevo set de 11 aislados candidatos confirmados por proteómica, pudimos observar una actualización tanto de frecuencia, como de distribución relativa de especies bacterianas

dentro del estudio. Estos indicadores desprendidos de la identificación bacteriana actualizada corresponden a: *E. coli* 62,50% (n=35), *Prototheca* spp. 5,36% (n=3), *Pseudomonas fluorescens* 5,36% (n=3), *Pseudomonas aeruginosa* 3,57% (n=2), *K. oxytoca* 3,57% (n=2), *S. uberis* 1,79% (n=1), *Enterobacter* spp. 1,79% (n=1), *Serratia liquefaciens* 1,79% (n=1), *Ranheella aquatilis* 1,79% (n=1), y *Lelliottia amnigena* 1,79% (n=1), respectivamente (Fig. 2.). Además, de las especies bacterianas identificadas y ratificadas, la frecuencia del grupo de aislados sin clasificación también se modificó, observando un aumento hasta el 10,71% (n=6) de la distribución relativa porcentual del total de aislados evaluados en este estudio (Fig. 2.). Con respecto a los nuevos hallazgos, es interesante observar que especies bacterianas como *R. aquatilis*, *L. amnigena* y *P. fluorescens* las cuales están más asociadas a contaminación de productos lácteos en la industria procesadora, puedan ser aisladas desde IMI en rebaños lecheros (ADSA, 2022; Sanschagrín et al., 2024). Por otro lado, especies como *P. aeruginosa* y *S. liquefaciens*, si han sido descritas como patógenos causantes de brotes de IMI en rebaños lecheros (Todhunter et al., 1991; Daly et al., 1999). Junto a lo anterior, y considerando que pueden darse resultados de este tipo, fue mandatorio tener que buscar y barajar alternativas de redirección estratégica en cuanto a los objetivos de este estudio, con la finalidad de poder darle utilidad científica a los resultados obtenidos en esta investigación. Es por esto por lo que, bajo este escenario de resultados, la mejor avenida bajo el criterio técnico de nuestro equipo fue continuar las evaluaciones propuestas en este

estudio utilizando las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de muestras de leche con IMI subyacente (n=2). Dentro de los criterios de elección para tomar esta decisión podemos mencionar, que tanto *P. aeruginosa*, como *K. pneumoniae* son patógenos gramnegativos de cohorte ambiental y poseen la capacidad de producir IMI en rebaños lecheros (Roberson et al., 2004; Munoz & Zadoks, 2007; Munoz et al., 2007; Rowe & Tranter, 2014; Schauer et al., 2021; Petridou et al., 2021). Por otro lado, ha sido descrita la presencia de ambos patógenos asociada a biopelículas tanto en superficies de material intrahospitalarios, asociado a infecciones nosocomiales según reportan Martin & Bachman (2018) y Wang et al. (2020) para *K. pneumoniae*, y según reportan Lee et al. (2017) y Kim et al. (2016) para *P. aeruginosa*. Además de también estar descrita la presencia y participación tanto de *K. pneumoniae*, como *P. aeruginosa* en biopelículas asociadas a superficies de equipos de ordeño de granjas lecheras (Latorre et al., 2010, 2022; Gonzalez-Cordova et al., 2024). Es por lo anterior, que las próximas evaluaciones presentadas durante esta investigación, tendrán la participación de cepas de ambas especies, *K. pneumoniae* proveniente de BTM y AMES (Tabla 5.), y *P. aeruginosa*, proveniente de IMI de curso subclínico y BTM, respectivamente (4.). Las cepas de *P. aeruginosa* provenientes de BTM, fueron seleccionadas estratégicamente desde el stock de BGC-Isolates (Laboratorio LIMCAL, Universidad de Concepción, Chillán). Estas cepas de *P. aeruginosa* fueron colectadas en el marco de un proyecto de investigación anterior en 7 granjas diferentes de la región de Ñuble.



**Figura 2.** Frecuencia y distribución relativa porcentual actualizada (n=56) de especies bacterianas identificadas mediante técnicas de microbiología convencional de consenso internacional y confirmadas mediante MALDI-TOF de muestras de leche individual de vacas con infecciones intramamarias en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos durante el período de octubre del 2023 a junio del 2024. S/C: sin clasificar.

En este punto del estudio es donde podemos postular que las técnicas microbiológicas convencionales para la identificación y caracterización morfológica de bacterias del grupo coliformes necesitan precisarse y actualizarse. Lo anterior debido a que, pese a seguir completamente los procedimientos y protocolos de estándar internacional, se presentó una brecha en la sensibilidad de las pruebas para poder identificar a nivel de especies algunas bacterias como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *Enterobacter* spp. principalmente, ya que *E. coli*, es bastante más sencilla de diferenciar por la morfología de sus colonias en agar MacConkey (Tabla 1.).

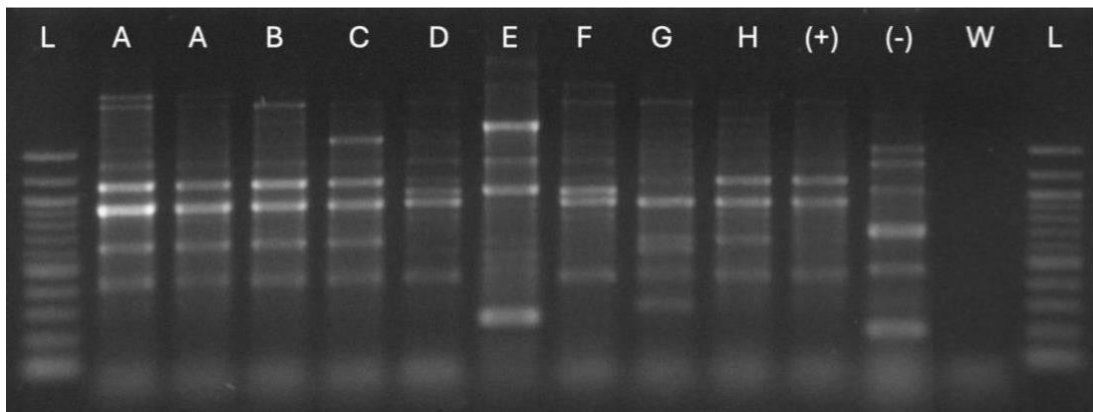
## Caracterización y tipificación molecular de cepas de *K. pneumoniae* y *P.*

### *aeruginosa*

La mayoría de los aislados analizados (n=16; 7 de *K. pneumoniae* y 9 de *P. aeruginosa*) correspondieron a aislados obtenidos desde muestras de leche de tanque (BTM). Junto a esto, de los aislados obtenidos de BTM, 7 (43,75%), 4 (25,00%) correspondió a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, respectivamente. Por otro lado, con respecto a los aislados obtenidos desde muestras de IMI y AMES, correspondieron a 2 (12,50%) *P. aeruginosa* y 3 (18,75%) *K. pneumoniae*, respectivamente. El número máximo de cepas de una misma granja corresponde a 2 (12,50%), tanto de *P. aeruginosa* (granja n° 1) y *K. pneumoniae* (granja n°12 y n°13). Las demás cepas de ambas especies provienen desde distintas granjas lecheras, entre la región de Los Ríos y la región de Ñuble (Tabla 4. y Tabla 5.).

Los 16 aislados totales tipificados mediante RAPD fueron separados por especie en dos grupos, un grupo de 9 *P. aeruginosa* y otro grupo 7 *K. pneumoniae*, respectivamente. Evaluando así, dos grupos completamente independientes. Cada uno de estos grupos, a su vez, fueron evaluados por dos investigadores independientes y categorizados según el criterio descrito por Tenover et al. (1995). Como resultado de este análisis, se identificaron 8 tipos RAPD principales para *P. aeruginosa* (A, B, C, D, E, F, G y H), en donde el tipo RAPD A, fue el más frecuentemente aislado (n=2), siendo categorizado como cepas con patrones de banda indistinguibles, por lo cual podemos

asumir que la misma cepa de *P. aeruginosa*. Por otro lado, los otros 7 tipos RAPD (B, C, D, E, F, G y H), fueron categorizados como cepas con patrones de bandas no relacionados entre ellas (Figura 3. y Tabla 5.). Con respecto a resultado de las cepas de *K. pneumoniae*, se identificaron 5 tipos RAPD principales (A, B, C, D, E), en donde tanto el tipo RAPD A y B, fueron los más frecuentemente aislados (n=2). Tanto las dos cepas de tipo RAPD A, como las dos cepas de tipo RAPD B, se categorizaron como patrones de banda indistinguibles para cada uno de los tipos. Sin embargo, los otros 3 tipos RAPD (C, D y E), fueron categorizados como cepas con patrones de bandas no relacionados entre ellas (Figura 4. y Tabla 5.). Cabe destacar que la totalidad de los tipos RAPD A, tanto para *P. aeruginosa* (n=2) como para *K. pneumoniae* (n=2) y el tipo RAPD B de *K. pneumoniae* (n=2), fueron aislados exclusivos dentro de sus respectivas granjas (granja n°1, n°12 y n°13, respectivamente), diferenciándose completamente de las cepas de otras granjas (Tabla 4. y Tabla 5.).

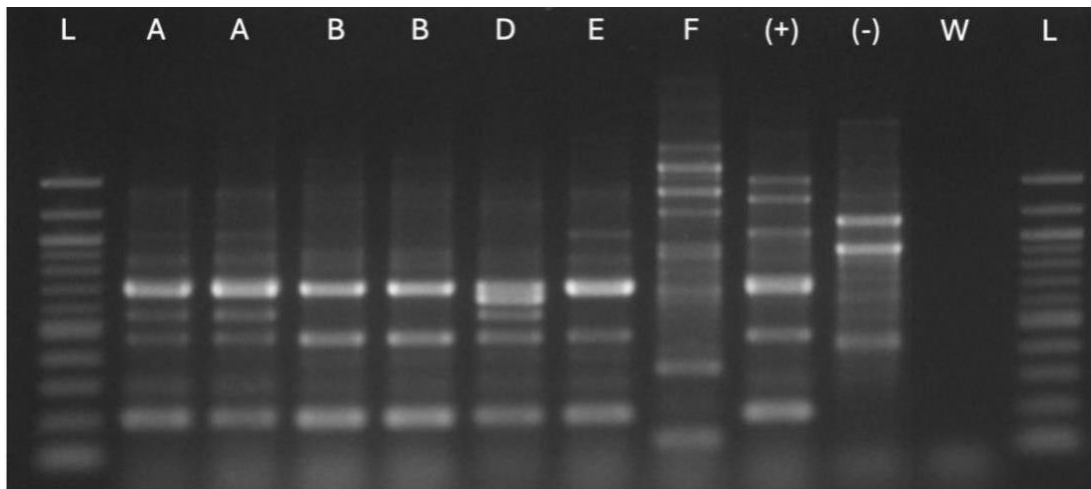


**Figura 3.** Patrones de banda de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos mediante RAPD-PCR utilizando set de primers ERIC2 - ERIC1026, para tipificación molecular de 9 aislados según describe Munoz et al. (2007), recuperados de infecciones intramamarias subclínicas y leche de tanque, provenientes 1 granja de la región de Los Ríos y 7 granjas diferentes en la región del Ñuble, respectivamente.

L: DNA Ladder 100 bp. (+): ATCC 15442 *P. aeruginosa*. (-): (de izquierda a derecha), ATCC 13883 *K. pneumoniae* y control sin inóculo, respectivamente. W: control negativo H2O.

En base a los resultados obtenidos, la información epidemiológica de las cepas de *P. aeruginosa* tipo RAPD A (granja n°1), indican que ambas provienen de IMI de curso subclínico de diferentes cuartos mamarios, dentro de la misma vaca. Con una diferencia de 3 semanas entre ambos casos de IMI. Esto podría sugerir, la posibilidad de un caso de IMI por *P. aeruginosa* de tipo contagioso entre diferentes cuartos mamarios. Sin embargo, también debemos considerar la posibilidad de un “punto fuente” que actúe como reservorio de este patógeno ambiental y ubicuo dentro de los planteles lecheros. Con respecto a los reservorios más frecuentes de *P. aeruginosa* en granjas lecheras, deberíamos considerar diferentes superficies húmedas en

el ambiente de la granja y abastecimientos de agua contaminados. Al mismo tiempo *P. aeruginosa* también tiene la capacidad de transformar objetos en fomites de diferentes naturalezas, como lo pueden ser dippings, tratamientos antibióticos, material de cama, y toallas para el secado de los pezones en la rutina de pre ordeño, todos contaminados por este patógeno de cohorte ambiental (Daly et al., 1999; Schauer et al., 2021). Sumado a lo anterior, también está descrito que dentro de la paleta de factores de virulencia de *P. aeruginosa*, que le permiten invadir y generar daño en tejido glandular, también se encuentra la capacidad de secretar sustancia poliméricas para crear una matriz que promueve la formación de biopelículas (Thi et al., 2020). Sin embargo, hasta la fecha, no hay ningún estudio que describa la capacidad de poder producir IMI de carácter contagioso entre vacas o entre cuartos, considerando que las cepas de *P. aeruginosa* tipo RAPD A (B04 y B05), no son precisamente una cepa que posea una alta habilidad de adherencia a superficies, comparadas con las cepas de las BTM (Tabla 5.).



**Figura 4.** Patrones de banda de aislados de *Klebsiella pneumoniae* obtenidos mediante RAPD-PCR utilizando set de primers ERIC2 - ERIC1026, para tipificación molecular de 7 aislados según describe Munoz et al. (2007), recuperados de leche de estanque y adherencias en superficies de equipo de ordeño, provenientes de 10 granjas diferentes en la región del Ñuble.

L: DNA ladder. (+): ATCC 13883 *K. pneumoniae*. (-): (de izquierda a derecha) ATCC 15442 *P. aeruginosa* y control sin inóculo, respectivamente. W: control negativo H2O.

Considerando los diferentes tipos de RAPD tanto para *P. aeruginosa*, como para *K. pneumoniae*, la diversidad de cepas de *P. aeruginosa* obtenidas a partir de IMI y BTM resultó en un SID, de 0,97, teniendo en cuenta que además del tipo RAPD A (n=2), las demás cepas provienen todas de granjas no relacionadas entre sí (desde la granja n°2 hasta la granja n°8). En cambio, la diversidad para cepas de *K. pneumoniae* obtenidas a partir de BTM y AMES resultó en un SID, de 0.90, aun considerando que el total de las cepas (RAPD A, B, C, D, E) provienen de 5 granjas diferentes, sabiendo que A (n=2) y B (n=2) provienen de las mismas granjas de origen (granja 12 y granja n°13, respectivamente). El resultado anterior indica que, si se toman dos cepas al

azar dentro de la población de *P. aeruginosa* aislada IMI y BTM, hay un 97% de probabilidades que sean diferentes, sin embargo, para la población de *K. pneumoniae* aislada de BTM y AMES, hay un 90% de probabilidades de que sean diferentes. Esto es, considerando significativo diferencias en valor de p iguales o menores a 0,05. Junto a lo anterior, la gran diversidad de cepas de *P. aeruginosa* provenientes desde muestras de BTM desde diferentes granjas condice completamente con lo descrito según Gagnon et al. (2025). Por otro lado, el poder de discriminación que estaba validado para ERIC-2/ERIC-1026 RAPD-PCR primer set según lo descrito por Munoz et al. (2006, 2007), también pudimos observarlo en la evaluación de tipificación molecular para cepas de *P. aeruginosa*, lo cual no estaba descrito para el set de primers respectivos. Sin embargo, al momento de la analizar y categorizar los patrones de banda de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* pudimos realizarlo de forma segura gracias a la diversidad de patrones de banda bien para cada una de las cepas.

**Tabla 4.** Caracterización genética y perfiles de adherencia *in vitro* de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecciones intramamarias y leche de tanque de 8 granjas lecheras de la región de Los ríos y la región de Ñuble.

Cepa	Origen	Granja	Tipo RAPD	OD <sup>4</sup> promedio adherencia <i>in-vitro</i>	Relación de adherencia (RA <sup>5</sup> )	Habilidad de adherencia <i>in vitro</i> <sup>6</sup>
B04	IMI <sup>1</sup>	1	A	0.153	0.327	Media
B05	IMI <sup>1</sup>	1	A	0.137	0.279	Media
B79	BTM <sup>2</sup>	2	B	0.426	0.772	Media alta
B80	BTM <sup>2</sup>	3	C	0.927	1.110	Alta
B85	BTM <sup>2</sup>	4	D	0.464	0.809	Media alta
B86	BTM <sup>2</sup>	5	E	0.072	0.000	Baja (C) <sup>7</sup>
B88	BTM <sup>2</sup>	6	F	0.467	0.812	Media alta
B89	BTM <sup>2</sup>	7	G	0.299	0.618	Media alta
B92	BTM <sup>2</sup>	8	H	1.556	1.335	Alta
15442	ATCC <sup>3</sup>	-	-	0.949	1.120	Alta

<sup>1</sup>IMI: Infección intramamaria; <sup>2</sup>BTM: leche de tanque; <sup>3</sup>ATCC: "American type culture collection". <sup>4</sup>OD: densidad óptica (590 nm); <sup>5</sup>RA: relación de adherencia calculada utilizando el OD promedio por cepa con respecto al OD promedio del control interno de baja habilidad de adherencia *in vitro* y corregido por el logaritmo natural ( $\text{Log}_e(x)$ ) de cada relación. <sup>6</sup>Criterios de categorización de habilidad de adherencia *in vitro*, Baja: RA < 0.037; Media: RA > 0.037 hasta 0.420; Media alta: RA > 0.420 hasta 1; Alta: RA > 1. <sup>7</sup>Control interno de cepa con baja habilidad de adherencia *in vitro*.

Con respecto a los resultados de los ensayos de formación de adherencia *in vitro* MPA, tanto para cepas de *P. aeruginosa* (Tabla 4.), como para cepas *K. pneumoniae* (Tabla 5.), se puede observar una gran rango de patrones de adherencia. En donde podemos evaluar que de las 9 cepas de *P. aeruginosa* solo 2, presentan una habilidad de adherencia *in vitro* media 22,22%. Justamente estas dos cepas B04 y B05, corresponden a los tipos RAPD A,

provenientes de IMI subclínica, y es probable que pueda tener una condición de contagiosa entre vacas o entre cuartos. Con respecto a las demás cepas de *P. aeruginosa* provenientes de BTM de diferentes granjas no relacionadas, estas poseen una habilidad de formación de adherencias categorizadas entre media-alta 44,44% (n=4) y alta 33,33% (n=3), sin considerar la cepa B86 RAPD E, que corresponde al control interno bajamente formador de adherencias 11,11% (n=1). Es probable que las cepas con mayor habilidad para formar adherencias, posean factores de virulencia asociados a la adhesión de superficies, la liberación de sustancias poliméricas y la promoción para formar biopelículas bacterianas (Thi et al., 2020). Permitiéndole así, poder persistir en el medio ambiente de la granja lechera. Sin embargo, las dos cepas tipo RAPD A, si bien poseen la misma habilidad de formación de adherencia, no destacan por ella. Aun así, es posible que tenga desarrollados otros mecanismos de virulencia involucrados, tales como, presencia de flagelo unipolar de movimiento natatorio, pilis de adhesión y proteasas que le permiten una mayor invasión y diseminación en el tejido glandular mamario (Köhler et al., 2000; Barken et al., 2008; Alhazmi, 2015).

**Tabla 5.** Caracterización genética y perfiles de adherencia *in vitro* de aislados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de leche de tanque y adherencias a superficies de equipos de ordeño de 5 granjas lecheras de la región de Ñuble.

Cepa	Origen	Granja	Tipo RAPD	OD <sup>4</sup> promedio adherencia <i>in-vitro</i>	Relación de adherencia (RA <sup>5</sup> )	Habilidad de adherencia <i>in vitro</i> <sup>6</sup>
B93	AMES <sup>1</sup>	12	A	0,119	0,074	Media
B94	AMES <sup>1</sup>	12	A	0,110	0,000	Baja (C) <sup>7</sup>
B95	BTM <sup>2</sup>	13	B	0,291	0,969	Media alta
B96	BTM <sup>2</sup>	13	B	0,273	0,905	Media alta
B97	AMES <sup>1</sup>	14	C	1,210	2,395	Alta
B98	BTM <sup>2</sup>	15	D	0,438	1,379	Alta
B99	BTM <sup>2</sup>	16	E	0,484	1,478	Alta
13883	ATCC <sup>3</sup>	-	-	0,014	-2,075	Baja

<sup>1</sup>IMI: Infección intramamaria; <sup>2</sup>BTM: leche de tanque; <sup>3</sup>ATCC: "American type culture collection". <sup>4</sup>OD: densidad óptica (590 nm); <sup>5</sup>RA: relación de adherencia calculada utilizando el OD promedio por cepa con respecto al OD promedio del control interno de baja habilidad de adherencia y corregido por el logaritmo natural [ $\text{Log}_e(x)$ ] de cada relación. <sup>6</sup>Criterios de categorización de habilidad de adherencia *in vitro*, Baja: RA < 0.037; Media: RA > 0.037 hasta 0.420; Media alta: RA > 0.420 hasta 1; Alta: RA > 1. <sup>7</sup>Control interno de cepa con baja habilidad de adherencia *in vitro*.

Por otra parte, con respecto a las cepas de *K. pneumoniae* el 42,85% (n=3) presentó una habilidad de adherencia *in vitro* alta, el 28,57% (n=2) una habilidad de adherencia media alta y el 14,28% (n=1) una habilidad de adherencia media. Además, del 14,28% correspondiente al control interna de baja habilidad de adherencia (B94) uno de los dos tipos RAPD A, pertenecientes a la granja 12 colectados a partir de muestras de AMES. Cabe destacar en este punto que, la cepa de *K. pneumoniae* con mayor habilidad de adherencia *in vitro* corresponde a la cepa tipo RAPD C, colectada a partir de AMES en una granja diferente a las demás. Considerando la corrección por el logaritmo natural, podemos observar que la cepa obtuvo el doble de valor en términos de la relación de adherencia calculada en base a la cepa menos adherente (Control 094). Algo particular que llama la atención en este punto, es que la ATCC 13883 de *K. pneumoniae* presenta el doble menos de adherencia aproximadamente que el control interno de baja adherencia *in vitro*. Por lo que el método de cálculo de habilidad de adherencia en base al modelo matemático propuesto por Munoz et al. (2024), es altamente específico y versátil en términos de comparación de relaciones de adherencias, al tener valores de corte estandarizados por categoría, es posible modificar la evaluación para cualquier cepa bacteriana, siempre y cuando se calcule la relación de adherencia (RA), con el control menos adherente del set de aislados a evaluar. Esta capacidad de poder modificar, sin necesidad de tener un control fijo estándar para todos, sino más bien, estandarizar el método de cálculo, permite poder evaluar la habilidad de

adherencia *in vitro* para cualquier set de aislados, siempre y cuando se siga el procedimiento estandarizado de consenso internacional en base a estudios que describen diferentes métodos y formas de calcular la habilidad *in vitro* de adherencia (Stepanovic et al., 2000; Latorre et al., 2011; deCampos et al., 2016; Massé et al., 2020; Fidelis et al., 2024).

Por otra parte, en la comparativa multi-especie entre cepas de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, podemos decir según lo observado, que ambas especies bacterianas, poseen cepas altamente especializadas para la adhesión inicial y muy probablemente la promoción de biopelículas bacterianas nativas en ambientes de granjas lecheras en todo el mundo. Particularmente cepas provenientes de BTM, poseen un doble rol descrito en términos de la epidemiología de IMI en rebaños lecheros susceptibles. En primer lugar, puede formar reservorios o puntos fuente dentro del plantel lechero y con mayor frecuencia en superficies dentro del equipo de ordeño, los cuales permiten un aumento en la presión de infección de vacas susceptibles al momento de la ordeña. Pudiendo modificar completamente la dinámica de IMIs tanto de carácter clínico, cómo subclínico dentro de un rebaño lechero (Hertl et al., 2010; Chao et al., 2014; Cheng et al., 2020). Finalmente, en segundo lugar, el rol que tienen estos patógenos bacterianos como motores de contaminación de BTM, también está altamente descrito para una serie de patógenos mamarios de cohorte contagioso y ambiental (Latorre et al., 2010, 2011, 2022; Massé et al., 2020). Finalmente, el tener una herramienta

estandarizada para poder evaluar la habilidad de adherencia *in vitro* de patógenos bacterianos, permite poder comparar bajo el mismo estándar de evaluación, este indicador “*screening*”, que bajo ningún concepto va a predecir al completo la performance que tengan ciertos patógenos altamente especializados en promover y producir biopelículas bacterianas, tanto en ambientes intrahospitalarios, en planteles de explotación animal y en la industria de procesamiento de alimentos (ADSA, 2022). Sin embargo, permite tener consenso al momento de comparar los resultados de este simple indicador, que puede predecir con cierta especificidad el comportamiento real de patógenos bacterianos en su ambiente nativo.

## V. CONCLUSIONES

1. La determinación de frecuencia inicial para los aislados “*targets*” del estudio fue muy baja, obteniéndose solo 2 aislados de *P. aeruginosa* y ninguno de *K. pneumoniae*. El estudio se complementó con cepas de ambas especies aisladas anteriormente.
2. Tanto para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* se obtuvieron patrones genéticos diferentes para cada una de las granjas, exceptuando una cepa clonal de *P. aeruginosa* aislada de IMI. Pudiendo observarse un posible comportamiento epidemiológico contagioso de *P. aeruginosa* en diferentes cuartos mamarios de una misma vaca susceptible.
3. La habilidad de adherencia *in vitro* fue mayor para cepas de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* aisladas de muestras de BTM y AMES, en comparación con cepas aisladas de IMI. La cepa con mayor habilidad de adherencia *in vitro* correspondió a *K. pneumoniae* (AMES).
4. Cepas de *P. aeruginosa* presentaron un perfil de adherencia (frecuencia de cepas con habilidad alta y media alta) mayor que las cepas de *K. pneumoniae* analizadas en este estudio.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abstracts of the 2022 American Dairy Science Association® Annual Meeting Journal of Dairy Science, Volume 105, 1 – 474
2. Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*-pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2), 44. <http://dx.doi.org/10.5539/ijb.v7n2p44>
3. APHIS Recommendations for Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 Virus in Livestock for State Animal Health Officials, Accredited Veterinarians and Producers. USDA (2024).
4. Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C. B., Engel, J. N., & Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*, 10(9), 2331–2343. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x>
5. Boutet, P., Boulanger, D., Gillet, L., Vanderplasschen, A., Closset, R., Bureau, F., & Lekeux, P. (2004). Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4104–4114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73553-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73553-5)
6. Bradley, A. J., & Green, M. J. (2001). An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical coliform mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1632–1639. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74598-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74598-5)
7. Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253–258. <https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253>

8. Brindhadevi, K., Lewis Oscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Process Biochemistry* (Vol. 96, pp. 49–57). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
9. Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., & Duchateau, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. In *Veterinary Research* (Vol. 34, Issue 5, pp. 521–564). <https://doi.org/10.1051/vetres:2003023>
10. Chao, Y., Marks, L. R., Pettigrew, M. M., & Hakansson, A. P. (2014). *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00194>
11. Cheng, J., Zhang, J., Han, B., Barkema, H. W., Cobo, E. R., Kastelic, J. P., Zhou, M., Shi, Y., Wang, J., Yang, R., & Gao, J. (2020). *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis is cytopathogenic for bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3493–3504. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17458>
12. Dahl-Pedersen, K., Herskin, M. S., Houe, H., & Thomsen, P. T. (2018). Risk factors for deterioration of the clinical condition of cull dairy cows during transport to slaughter. *Frontiers in Veterinary Science*, 5 (NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00297>
13. Daly, M., Power, E., Björkroth, J., Sheehan, P., O'Connell, A., Colgan, M., Korkeala, H., & Fanning, S. (1999). Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. *Appl Environ Microbiol.* 65(6), 2723–2729. DOI: 10.1128/AEM.65.6.2723-2729.1999
14. de Campos, P. A., Royer, S., Batistão, D. W., Araújo, B. F., Queiroz, L. L., de Brito, C. S., Gontijo-Filho, P. P., & Ribas, R. M. (2016). Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. *Current microbiology*, 72(5), 617–627. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-0996-x>

15. Du Preez, J. H. (2000). Bovine mastitis therapy and why it fails: continuing education. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(3), 201-208.
16. Erskine, R. J., Bartlett, P. C., VanLente, J. L., & Phipps, C. R. (2002). Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2571–2575. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74340-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74340-3)
17. Fidelis, C. E., Orsi, A. M., Freu, G., Gonçalves, J. L., & Santos, M. V. do. (2024). Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Isolates from Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 11(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/vetsci11040170>
18. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 9, pp. 623–633). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
19. Fuenzalida, M. J., & Ruegg, P. L. (2020). Molecular epidemiology of nonsevere clinical mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* occurring in cows on 2 Wisconsin dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3479–3492. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17464>
20. Gagnon, M., Jean, S., de Toro-Martín, J., LaPointe, G., Guévremont, É., Dufour, S., & Roy, D. (2025). Insights into the prevalence of *Pseudomonadota* and yeasts on milking system surface biofilms. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-26016>.
21. Gonçalves, J. L., Lee, S. H. I., de Paula Arruda, E., Galles, D. P., Caetano, V. C., de Oliveira, C. A. F., ... & dos Santos, M. V. (2015). Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy science*, 98(6), 3613-3621. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9248>
22. González-Córdova, B. A., Pacha, P. A., Garrido, N., Munoz, M. A. & Latorre, A. A. (2024). In vitro Adherence Ability Assessment of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* Isolates from Dairy Operations. *NMC Annual Meeting Proceedings (2024)*, 135-136.

23. Gröhn, Y. T., González, R. N., Wilson, D. J., Hertl, J. A., Bennett, G., Schulte, H., & Schukken, Y. H. (2005). Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 71(1–2), 105–125. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.06.002>
24. Grundmann, H., Hori, S., & Tanner, G. (2001). and the Discriminatory Abilities of Typing Methods for Microorganisms. 39(11), 4190–4192. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4190>
25. Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>
26. Hertl, J. A., Gröhn, Y. T., Leach, J. D. G., Bar, D., Bennett, G. J., González, R. N., Rauch, B. J., Welcome, F. L., Tauer, L. W., & Schukken, Y. H. (2010). Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1551–1560. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2599>
27. Hlland, C., Dufour, S., & Munoz, M. (2018). Milk Bacteriological Analysis Using MALDI-TOF Technology. *National Mastitis Council*, 1, 2–6.
28. Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
29. Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol.* 2016 Feb;54(2):71-85. Doi: 10.1007/s12275-016-5528-7. Epub 2016 Feb 2. PMID: 26832663.

30. Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(April 2017), 166–185. <https://doi.org/10.1111/tbed.12704>
31. Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechère J. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182: <https://doi.org/10.1128/jb.182.21.5990-5996.2000>
32. Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., Jayarao, B. M., Houser, B. A., Daugherty, C. S., & Schukken, Y. H. (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. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2717>
33. Latorre, A A, & Munoz, M. A. (2015). On-farm evaluation of surfaces in contact with milk during milking as a factor affecting the microbiological quality of bulk tank milk on Chilean dairy farms. A preliminary report. *Natl. Mastitis Council. Annu. Meet. Proc.*, 231-232.
34. Latorre, A A, & Munoz, M. A. (2019). Case study: Biofilms in milk hoses for diverted or discarded milk in Chilean dairy operations and their potential role in herd health and milk quality. *Natl. Mastitis Council. Annu. Meet. Proc.*, 139–140.
35. Latorre, Alejandra A., Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., Adolph, E., Sukhnanand, S., & Schukken, Y. H. (2011). Increased in vitro adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria Monocytogenes* strains in the milking system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3676–3684. <https://doi.org/10.1128/AEM.02441-10>
36. Latorre, Alejandra 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. DOI: 10.3389/fvets.2022.969455

37. Latorre, Alejandra Andrea, 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*, 17(1), 44–51. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2704>
38. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol*. 2017 Jun 28;27(6):1053-1064. doi: 10.4014/jmb.1611.11056. PMID: 28301918.
39. Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
40. Massé, J., Dufour, S., & Archambault, M. (2020). Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3392–3400. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17324>
41. Munoz, M. A., Ahlström, C., Rauch, B. J., & Zadoks, R. N. (2006). Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3425–3430. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72379-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72379-7)
42. Munoz, M. A., Bennett, G. J., Ahlström, C., Griffiths, H. M., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2008). Cleanliness scores as indicator of *klebsiella* exposure in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3908–3916. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1090>
43. Munoz, M. A., Gonzalez-Cordova, B. A., Valiente, R. E. & Latorre, A. A. Biofilm formation variability of *Klebsiella pneumoniae* isolated from both bulk tank and milking equipment adherences. *Safety and Quality - Microbiology section, World Dairy Summit, International Dairy Federation* (2024).
44. Munoz, M. A., & Zadoks, R. N. (2007). Short communication: Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1220–1224. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71610-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71610-7)

45. Munoz, Marcos A., Welcome, F. L., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2007). Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 3964–3971. <https://doi.org/10.1128/JCM.00795-07>
46. Nobrega, D. B., Calarga, A. P., Nascimento, L. C., Chande Vasconcelos, C. G., de Lima, E. M., Langoni, H., & Brocchi, M. (2021). Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 7210–7224. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19569>
47. Nonnecke, B. J., & Newbould, F. H. (1984). Biochemical and serologic characterization of *Klebsiella* strains from bovine mastitis and the environment of the dairy cow. *American journal of veterinary research*, 45(11), 2451-2454.
48. Ntuli, V., Njage, P. M. K., & Buys, E. M. (2016). Characterization of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae in producer-distributor bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9534–9549. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11403>
49. Oliveira, L., Hulland, C., & Ruegg, P. L. (2013). Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7538–7549. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6078>
50. Pacha, 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19121>
51. Paulin-Curlee, G. G., Sreevatsan, S., Singer, R. S., Isaacson, R., Reneau, J., Bey, R., & Foster, D. (2008). Molecular subtyping of mastitis-associated *klebsiella pneumoniae* isolates shows high levels of diversity within and between dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 554–563. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0479>

52. Petridou, E. J., Fragkou, I. A., Lafi, S. Q., y Giadinis, N. D. (2021). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in a dairy cow herd in northern Greece and its control with an autogenous vaccine. *Pol J Vet Sci.* 24(2), 303–305. DOI: 10.24425/pjvs.2021.137666
53. Pirner, L. H., Petzl, W., Gangl, A., Huber-Schlenstedt, R., & Sorge, U. S. (2024). In vitro antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* on Bavarian dairy farms between 2014-2022. *Journal of Dairy Science.* <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24536>
54. Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2433–2441. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73366-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4)
55. Porter, J., Anderson, J., Carter, L., Donjacour, E., & Paros, M. (2016). In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2053–2062. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9748>
56. Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Kelton, D. F., & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366–1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
57. Roberson, J. R., Warnick, L. D., & Moore, G. (2004). Mild to moderate clinical mastitis: Efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 583–592. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73200-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73200-2)
58. Rodriguez, J., Sepúlveda-García, P., Canales, N., Goddard, M., Cornuy, C., Morales, Á. G., Collado, L., & Mella, A. (2025). Molecular and Phenotypic Characterization of *Prototheca* Species Isolates Associated with Bovine Mastitis Cases in Chile. *Animals*, 15(19), 2869. <https://doi.org/10.3390/ani15192869>.

59. Rowe, S. y Tranter, B. (2014). Case Report -Pseudomonas mastitis in a dairy herd. *The Australian Cattle Veterinarian*. 73, 20-21. [https://www.ava.com.au/library-resources/library/ava-scientific-journals/acv/2014/case-report--pseudomonas-mastitis-in-a-dairy-herd/Case\\_Report\\_Pseudomonas\\_mastitis.pdf](https://www.ava.com.au/library-resources/library/ava-scientific-journals/acv/2014/case-report--pseudomonas-mastitis-in-a-dairy-herd/Case_Report_Pseudomonas_mastitis.pdf)
60. Sanschagrín, L., Paniconi, T., Martínez, A. C. S., Jubinville, E., Goulet-Beaulieu, V., Goetz, C., ... & Jean, J. (2024). Identification and characterization of microorganisms isolated from noncompliant or atypical dairy products in Canada. *Journal of Dairy Science*, 107(10), 7659-7677. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24506>.
61. Sampimon, O. C., Riekerink, R. O., & Lam, T. J. G. M. (2008). Prevalence of subclinical mastitis pathogens and adoption of udder health management practices on Dutch dairy farms: preliminary results. In *Mastitis control* (pp. 37-46). Wageningen Academic. [https://doi.org/10.3920/9789086866496\\_003](https://doi.org/10.3920/9789086866496_003)
62. Schauer, B., Wald, R., Urbantke, V., Lončarić, I., y Baumgartner, M. (2021). Tracing Mastitis Pathogens-Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals*. 11(2), 279. DOI:10.3390/ani11020279.
63. Schmenger, A., & Krömker, V. (2020). Characterization, cure rates and associated risks of clinical mastitis in Northern Germany. *Veterinary sciences*, 7(4), 170.
64. Schönborn, S., Wente, N., Paduch, J. H., & Krömker, V. (2017). In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. *Journal of Dairy Research*, 84(2), 198–201. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000218>
65. Schukken, Y., Chuff, M., Moroni, P., Gurjar, A., Santisteban, C., Welcome, F., & Zadoks, R. (2012). The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis. *Klebsiella, Serratia, and More*. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 28, Issue 2, pp. 239–256). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.04.001>

66. Schukken, Y. H., Hertl, J., Bar, D., Bennett, G. J., González, R. N., Rauch, B. J., Santisteban, C., Schulte, H. F., Tauer, L., Welcome, F. L., & Gröhn, Y. T. (2009). Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3091–3105. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1557>
67. Schukken, Ynte H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H. J., Sipka, A., Smith, D. G. E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N., & Seyfert, H. M. (2011a). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3–4), 270–289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>
68. Schukken, Ynte H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H. J., Sipka, A., Smith, D. G. E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N., & Seyfert, H. M. (2011b). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3–4), 270–289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>
69. Shinozuka, Y., Kaneko, S., Kurose, T., Watanabe, A., Kuruhara, K., & Kawai, K. (2016). Factors associated with marketable milk production recovery after treatment of naturally occurring acute coliform mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), 917–920. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0689>
70. Silva, N., & Costa, G. M. (2001). An outbreak of acute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in a dairy herd. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53, 401-405.
71. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. In *Journal of Methods Microbiological Journal of Microbiological Methods* (Vol. 40). [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth) [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)

72. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>.
73. Thi, M. T. T., Wibowo, D., y Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Internat J Mol Sci.* 21(22), 8671. DOI:10.3390/ijms21228671
74. Todhunter, D. A., Smith, K. L., & Hogan, J. S. (1991). *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *Journal of dairy science*, 74(6), 1860-1865. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78351-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78351-3).
75. Vogel, L., Jones, G., Triep, S., Koek, A., & Dijkshoorn, L. (1999). RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clinical Microbiology and Infection*, 5(5), 270–276. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00140.x>
76. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *klebsiella pneumoniae*. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 17, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
77. Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., McSweeney, K. D., Dinsmore, R. P., Goodell, G., & Callan, R. J. (2001). Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(7), 976-981. DOI: 10.2460/javma.2001.219.976
78. Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., Dinsmore, R. P., & Callan, R. J. (2001). Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(4), 567-572. DOI: 10.2460/javma.2001.218.567

79. Wenz, J. R., Fox, L. K., Muller, F. J., Rinaldi, M., Zeng, R., & Bannerman, D. D. (2010). Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2458–2470. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2819>
80. Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, Okuom M, Huber C, Brooks TD, Wilson E, Clement B, Wentworth CD, Holmes AE. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol*. 2017 Dec;6(4): <http://www.rroj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf>. Epub 2017 Oct 24. PMID: 30214915; PMCID: PMC6133255.
81. Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 344–359). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
82. Zadoks, R. N., Griffiths, H. M., Munoz, M. A., Ahlstrom, C., Bennett, G. J., Thomas, E., & Schukken, Y. H. (2011). Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: Be careful where you walk. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 1045–1051. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3603>
83. Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis causes and control. In *Journal of animal science* (Vol. 86, Issue 13 Suppl, pp. 57–65). <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0302>