



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
AISLADAS DESDE MUESTRAS DE LECHE PROVENIENTES DE  
VACAS CON MASTITIS BOVINA CLÍNICA Y SUBCLÍNICA

**DANIEL IGNACIO CARTES LILLO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA  
Proyecto FIA PYT 0055-2012

**SANTIAGO, CHILE**  
2014



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli*  
AISLADAS DESDE MUESTRAS DE LECHE PROVENIENTES DE  
VACAS CON MASTITIS BOVINA CLÍNICA Y SUBCLÍNICA

**DANIEL IGNACIO CARTES**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: LEONARDO SÁENZ	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: PATRICIO RETAMAL	.....	.....
PROFESORA CONSEJERA: CONSUELO BORIE	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2014

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio, quienes me apoyaron en todo momento, especialmente a John Quiroga y Marcela Molina. Finalmente a Fabiola por todo el cariño.

## MEMORIA DE TÍTULO

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DESDE MUESTRAS DE LECHE PROVENIENTES DE VACAS CON MASTITIS BOVINA CLÍNICA Y SUBCLÍNICA”.**

**“MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM MILK SAMPLE OF CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS COWS”**

**Daniel Ignacio Cartes Lillo \***

\*Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

### **Financiamiento**

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FIA – PYT 2012 – 0055.

## **RESUMEN**

La mastitis bovina es uno de los problemas de mayor impacto económico en la industria láctea en Chile y alrededor del mundo. Esta enfermedad puede ser producida por traumas, hongos, algas, bacterias, entre otras causas. Dentro de los agentes bacterianos, *E. coli* es la de mayor importancia en granjas chilenas con animales en confinamiento, produciendo una mastitis de curso corto y signos visibles.

Por esta razón en la presente memoria se evaluó la presencia de genes codificantes a factores de virulencia, asociados a la etapa de adhesión, descrita como de gran importancia en la patogenia de *E.coli*. Muestras provenientes de vacas cursando mastitis bovina clínica y subclínica de las zonas central (Región Metropolitana) y sur (Región de Los Lagos) fueron analizadas, a través de técnicas microbiológicas como el cultivo bacteriano y baterías bioquímicas en conjunto con técnicas basadas en el DNA como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

De los 150 animales muestreados, solo 24 de estos mostraron ser positivos a *E. coli*. Asimismo tras evaluar 5 genes asociados a adhesinas, solo dos de estos se encontraron presentes en cuatro muestras. En todos los casos se encontró solo un gen por muestra. Los resultados concuerdan con otros estudios realizados en otros países, y sugieren que no existe una relación entre determinados factores de virulencia y, la presentación y severidad de la enfermedad.

**Palabras claves:** mastitis bovina, *Escherichia coli*, factores de virulencia, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## **ABSTRACT**

Cow mastitis is the most costly problem in the dairy industry in Chile and around the world. This disease can be caused by trauma, fungi, algae, bacteria, among other causes. Within the group of bacterial agents, *E. coli* is the most important in Chilean farms with dairy cattle in confinement, producing a short and intense mastitis and visible signs in the animal.

For this reason the presence of coding genes to virulence factors associated with adhesion step and are described as important in the pathogenesis of *E. coli* genes were evaluated. Samples analyzed are coming from cow with clinical and subclinical mastitis. For this purpose, microbiological techniques as bacterial culture and biochemical batteries together with techniques based on DNA as the Polymerase Chain Reaction (PCR) were used.

A total of 150 animals were sampled and only 24 of these were positive for *E. coli*. Also, this study sought five genes associated to adhesins, only two of these were present in four samples. In all cases, we found only one gene per sample. The results are consistent with other studies conducted in other countries, suggesting that there isn't a relationship between certain virulence factors and the incidence and severity of disease.

**Keywords:** cow mastitis, *Escherichia coli*, virulence factors, *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Mastitis bovina.**

La Federación Internacional de Lechería en 1999, define la mastitis bovina como una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria, que se produce con la finalidad de eliminar el agente patógeno y restaurar la funcionalidad del órgano (Concha, 2007). Asimismo, para la mayoría de los autores existen dos categorías principales de mastitis; subclínica (MSC) y clínica (MC) (Kruze, 1988; Philpot, 1999). La primera se caracteriza por no generar una inflamación visible a nivel de la glándula mamaria, ni cambios macroscópicos en la leche, siendo necesarias pruebas cualitativas como el test California Mastitis Test (CMT), realizado en campo o pruebas cuantitativas como el Recuento de Células Somáticas (RCS) realizado por el servicio de control lechero, que determinen los cambios ocurridos en la leche producto de la inflamación (Concha, 2007). En cambio, la mastitis clínica se caracteriza por generar cambios visibles en la leche, glándula mamaria, o incluso, un compromiso sistémico del animal (Kruze, 1988; Philpot, 1999).

### **1.2.- Agentes biológicos.**

Según Hogan y Smith (2001), más de 100 especies diferentes de microorganismos han sido reportados como causas de infecciones intramamarias (IIM) en vacas lecheras. Por un lado se encuentran agentes contagiosos como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) cuyo hábitat principal es el canal del pezón o la piel externa del mismo, produciéndose los contagios fundamentalmente durante la ordeña. A su vez, hay ciertos patógenos tales como coliformes (*E. coli*), *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, cuyo hábitat es el medio ambiente que rodea a los animales, de forma que el contagio se produce fundamentalmente en el periodo entre los ordeños, pudiendo también comportarse como contagioso durante la ordeña (Osteras *et al.*, 2006). Finalmente se encuentran patógenos oportunistas, integrado por diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), los que a menudo son denominados microorganismos oportunistas, ya que habitan zonas donde les es sencillo colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores. Estas bacterias son de elevado interés, debido a que son los microorganismos más frecuentemente aislados en vacas

y novillas de los rebaños, y en la actualidad se consideran patógenos emergentes de la mastitis bovina (Pyörälä y Taponen, 2009).

Actualmente en Chile no hay estudios publicados sobre la incidencia de patógenos involucrados en la aparición de mastitis, sin embargo, San Martín *et al.* (2002) concluyeron de estudios anteriores que en la zona sur son más frecuentes las mastitis contagiosas, cuyo principal agente etiológico es *S. aureus*. Asimismo, agentes SCN, generan un alto porcentaje de infecciones, considerando a las mastitis por *Streptococcus* spp. de importancia secundaria, sin embargo, en la zona central del país predomina la mastitis ambiental causada principalmente por coliformes como lo es *E. coli* (San Martín *et al.*, 2002).

### **1.3-. Mastitis por *Escherichia coli*.**

Los coliformes como *E. coli* se caracterizan por generar cuadros de curso corto, pero con signos clínicos evidentes (Osteras *et al.*, 2006), esto debido a su gran capacidad para replicarse en el organismo y para destruir las estructuras celulares. En la ubre bovina *E.coli* está relacionado con la generación de mastitis, principalmente clínica, alrededor del parto y durante la lactancia temprana, desencadenando notables signos locales y/o a veces graves signos sistémicos (Burvenich *et al.*, 2003). La gravedad de la enfermedad está determinada por varias interacciones entre el hospedero, el medio ambiente, y el agente infeccioso, sin embargo, según Burvenich *et al.* (2003) los factores que en mayor medida determinan la gravedad de la enfermedad son dependientes del hospedero. Estos pueden estar dados por la velocidad de la respuesta inflamatoria, la fase de lactancia y la edad de la vaca. Pese a esto, por parte del agente, *E. coli* expresa factores de virulencia específicos que contribuyen a su capacidad de causar infección. De hecho, según Kaper *et al.* (2004) las cepas patógenas de *E. coli* usan un esquema de múltiples etapas en la patogénesis, que es similar a la utilizada por otros patógenos de mucosas, consistiendo en la colonización de una zona de la mucosa, la evasión de las defensas del hospedero, su multiplicación y daños al hospedador.

### **1.4-. Adhesión y colonización**

La capacidad de la bacteria para adherirse a las células epiteliales es un factor esencial y necesario para la colonización de los tejidos del hospedero y el establecimiento del proceso infeccioso, sobre todo en tejidos no estériles como; mucosas, tracto urinario, y tejidos expuestos al medio ambiente, como el tracto intestinal. Sin embargo, estudios recientes han demostrado



que, además de jugar un papel esencial en la adhesión a la mucosa, las adhesinas de *E. coli* y sus receptores celulares también desempeñan funciones importantes en las etapas siguientes del proceso infeccioso, tales como la formación de depósitos bacterianos intracelulares, la inducción de la señalización celular y la inducción de la respuesta inmune innata (Le Bouguenec, 2005), ayudando así a la adaptación de la bacteria al entorno.

### **1.5-. Daño celular**

La virulencia de los coliformes y la inducción de una respuesta inflamatoria en el hospedero dependen de la capacidad de éstos para replicarse y para destruir las estructuras celulares. Durante su multiplicación, la destrucción y lisis, liberan un componente de la membrana externa, la endotoxina o lipopolisacárido (LPS), una molécula termoestable que es un componente estructural único de la pared celular de los patógenos Gram-negativos (Lohuis *et al.*, 1988).

El LPS es responsable de muchos signos fisiopatológicos observados durante infecciones bacterianas (Gram negativas) en los rumiantes, tales como fiebre, cambios en el número de leucocitos (leucopenia, leucocitosis), activación del complemento, activación de macrófagos, aumento de la permeabilidad vascular y cambios en los niveles plasmáticos de metabolitos. El LPS induce una respuesta de defensa, especialmente en dosis bajas. La administración intravenosa de altas dosis de LPS puede producir *shock* letal (Lohuis *et al.*, 1988).

Las cepas patógenas de *E. coli*, además, pueden producir una gran variedad de toxinas con diferentes actividades: enterotoxinas lábiles (LT) y estables al calor (ST), Shiga toxinas y factores de necrosis citotóxicos 1 y 2 (CNF1 y CNF2) (Lehtolainen, 2004). Las diversas toxinas son transportadas desde el citoplasma bacteriano a las células hospedero por varios mecanismos, posterior a la etapa de adhesión. Asimismo sus mecanismos de daño se generan al alterar o modificar la función normal de la célula hospedero, con la finalidad de ayudar a las bacterias a cruzar la barrera epitelial y para invadir el tejido (China y Goffaux, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

### **1.6-. Factores de virulencia**

Los principales grupos de factores de virulencia de *E. coli* patógenas están constituidas por adhesinas y toxinas. Las primeras ayudan a las bacterias a adherirse, colonizar y actuar como factores de adaptación (Anexo 1). En cambio las toxinas están dirigidas a diferentes funciones celulares y actúan en la lisis celular (Kaper *et al.*, 2004) (Anexo 2).

Los genes de estos factores de virulencia pueden estar presentes en el genoma de las bacterias o en elementos genéticos móviles, incluyendo los transposones, plásmidos, bacteriófagos y las islas de patogenicidad (Kaper *et al.*, 2004).

S y P fimbrias, se encuentran codificados por los operones *sfa* y *pap*, y están presentes generalmente en las cepas de *E. coli* extraintestinales que provocan cuadros infecciosos en el tracto urinario (Soto y Hultgren, 1999). Probablemente estos factores de virulencia son necesarios para la adherencia de las bacterias a los epitelios de las vías urinarias y se sugiere que participen en infecciones recurrentes y agudas de este sistema (Blanco *et al.*, 1997). Además de estas fimbrias, existe otra proteína ubicada en membrana externa de la bacteria, denominada intimina, la cual es codificada por el operón *eae*. Esta proteína no solo funciona como ligando para la adhesión celular de cepas enteropatógenas (EPEC) a la células del epitelio intestinal (Jerse *et al.*, 1990), sino que además es capaz de estimular la respuesta inmune TH1 a nivel de mucosas, provocando hiperplasia de las criptas intestinales (Higgins *et al.*, 1999). Otro factor de virulencia lo constituye una proteína de superficie como lo es Efa-1, en el caso de cepas enterohemorrágicas (EHEC), o también conocida como LifA en el caso de EPEC. Este factor se encuentra codificado por el gen *efa1* y constituye una proteína de superficie muy grande con la capacidad de inhibir la activación de linfocitos, así como de adhesión a epitelios (Klapproth *et al.*, 2000). Finalmente, dentro de los factores que promueven adherencia de cepas de *E. coli* a epitelios tanto intestinales como extraintestinales se encuentra la fimbria polar larga o LPF (*lfp*), la cual ha demostrado otorgar una mayor adhesión a cepas de *E.coli*, comparándola con otras sin el gen *lfp* (Torres *et al.*, 2004). Asimismo estudios de Dogan *et al.* (2012) sugieren que este factor podría mejorar la virulencia bacteriana en la glándula mamaria mediante la adhesión epitelial.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de genes asociados a la virulencia en aislados de *Escherichia coli* obtenidos desde muestras de leche provenientes de mastitis bovina clínica y subclínica, de la zona central y sur del país.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar la presencia de *E. coli* en los aislados de mastitis bovina clínica y subclínica.

-Determinar la presencia de algunos genes codificantes, asociados con la adhesión a epitelios y adaptación de *E. coli* al hospedador.

## **2.- MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente proyecto fue ejecutado en las dependencias del Laboratorio de Vacunas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

### **2.1.- MATERIALES**

#### **2.1.1. Obtención de muestras.**

El muestreo fue realizado en ganado lechero ubicado en predios de la zona central (Región Metropolitana) y sur del país (Región de Los Lagos), por Médicos Veterinarios asesores de éstos y por el autor. Se seleccionaron bovinos hembras que presentaban mastitis clínica, como fue definida anteriormente (sin tratamiento efectuado) y/o las hembras que estuviesen cursando mastitis subclínica, con recuentos de células somáticas entre 400.000 – 1.200.000, diagnosticado a través del test California Mastitis Test (CMT) o a través de control lechero.

#### **2.1.2. Muestras de leche.**

Se tomó una muestra compuesta por vaca, es decir, desde los cuartos afectados en conjunto, las cuales fueron recogidas de manera aséptica y guardadas en tubos estériles. Esto se realizó posterior a la desinfección de la punta del pezón con toallas desechables embebidas con alcohol isopropílico (70%) y la eliminación de los primeros tres chorros de leche. Para el transporte hacia el laboratorio, las muestras se congelaron inmediatamente a -18°C posterior a su extracción y luego se traspasaron a un *cooler* para el viaje, siendo mantenidas a menos de 4°C hasta el sitio de destino. El tiempo de transporte en ningún caso superó las 24 horas.

Se muestrearon 150 animales entre predios de ambas zonas, basado en la prevalencia descrita por San Martín *et al.* (2002) para *E. coli* (40,76% en la región Metropolitana versus 3,95% en la región De los Lagos).

### **2.2.- MÉTODOS**

#### **2.2.1. Procesamiento de muestras.**

a) Obtención de aislados.

Al llegar al laboratorio las muestras se sembraron en diferentes medios de cultivos sólidos (agar Manitol Salado, agar Sangre y agar Mac Conkey), con el propósito de iniciar la identificación no sólo de *E. coli*, sino además de otros agentes de importancia nacional en la generación de IIM, tales como *S. aureus*, *S. uberis*. Posteriormente, las placas se incubaron en estufa a 37°C por un período de 24 horas hasta la obtención de colonias, las que a continuación se sometieron a pruebas para la identificación fenotípica y genotípica, como se describirá a continuación para el caso *E. coli*.

*E. coli* genera colonias rojas con halo turbio en agar Mac Conkey, por la capacidad de fermentar la lactosa de este medio. Por esta razón se tomó una confluencia de colonias que posean dichas características, resultantes de la primera siembra, y mediante el mismo procedimiento anterior se sembraron e incubaron, obteniéndose un cultivo puro de *E. coli* por muestra. Las cepas de este último cultivo se sometieron en primer lugar a pruebas bioquímicas para enterobacterias tales como, triple azúcar hierro (TSI), producción de indol, descarboxilación lisina (LIA), citrato de Simmons y producción de urea (Forbes *et al.*, 2009) con la finalidad de realizar un diagnóstico fenotípico como *E. coli*, en base a las propiedades metabólicas de ésta. Posteriormente fueron sembradas en caldo Tripticasa de soya, con un 40% de glicerol (37°C/ 24 horas), lo que permitió conservar las colonias mediante congelación a -80°C y mantener un *stock* de trabajo.

#### b) Extracción de DNA.

Para tal fin, se prepararon homogeneizados en tubos eppendorf de 200 µL, compuestos por una solución de 100 µL de Tritón X-100 al 1% en buffer Tris-EDTA 1X (pH 8) y un extendido de la colonia pura por cada muestra. Posteriormente los tubos fueron introducidos al termociclador Swift Maxi Thermal Cycler ESCO, sometiéndolos a una temperatura de 95 °C por diez minutos, con el fin de desestabilizar pared-membrana celular y finalmente producir la lisis celular.

Posteriormente se introdujeron los tubos desde el termociclador a una centrifuga por dos minutos a 10.000 RPM (5.000 x g) con la finalidad de obtener el sobrenadante de cada uno de éstos, el que contendrá material genético de las bacterias contenidas en el extendido.

Finalmente en esta etapa, se evaluó el nivel de pureza y concentración de DNA (ng/µL), lo que fue medido en un espectrofotómetro WPA UV-Visible Biowave II. Para la pureza, se determinó la relación de absorbancia entre el DNA y las proteínas (A260/A280) de cada muestra, la que debía encontrarse sobre 1,6 si el DNA es más o menos puro. Seguido a esta etapa, las muestras se

consideraron aptas para su uso en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en el mismo Swift Maxi Thermal Cycler ESCO.

#### c) Identificación molecular

En este paso se procedió a complementar el diagnóstico fenotípico de todas las colonias de *E. coli* aisladas. Para esto se usó la identificación molecular basada en el análisis de la región espaciadora del DNA ribosomal 16s-23s, descrita por Gùrtler y Stanisich (1996). En este procedimiento se usó la metodología que se detalla a continuación.

#### d) Amplificación DNA.

Esta técnica requirió la preparación de un homogeneizado (*Mix*) en tubos de eppendorf de (200  $\mu$ L) o de PCR, compuestos por 25  $\mu$ L totales: 2,5  $\mu$ L de amortiguador de pH 10X (pH 8,3), 0,5  $\mu$ L de partidor (directo), 0,5  $\mu$ L de partidor (inverso), 0,2  $\mu$ L de deoxinucleósido trifosfato (DNTP) 10 mM, agua libre de nucleasas hasta completar 20,2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L de DNA bacteriano.

La amplificación se llevó a cabo siguiendo el programa de temperaturas de denaturalización inicial, denaturalización, alineamiento, extensión y extensión final específico para cada par de cebadores. Los cebadores o partidores elegidos correspondieron a la región espaciadora del DNA ribosomal 16s-23s (ITs), usada para la identificación de *E. coli* y a factores de virulencia asociados con la adhesión y adaptación de *E. coli* en el establecimiento del proceso infeccioso, más que a factores relacionados con el daño celular, como toxinas (Anexo 3).

El PCR se conformó con un control negativo, es decir, una muestra sin la presencia material genético bacteriano. Además, como control positivo se usaron cepas de *E. coli*, que contenían la presencia de los factores de virulencia en cuestión, donadas por el Dr. Roberto Vidal del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Por otro lado se emplearon 2 $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 pbs.

#### e) Electroforesis

Los productos resultantes de la amplificación del PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, la cual es preparada con una solución amortiguadora Tris-Ácido acético-EDTA (TAE) al 1X y finalmente teñidos con GelRed® (5 $\mu$ L/100mL de agarosa). La reacción fue hecha en cubetas plásticas Bio-Rad en un medio amortiguado con TAE al 1X, con un pH cercano al neutro (7,5).

Se aplicó un voltaje de 80-85 V durante una hora aproximadamente. Finalmente los patrones de bandas se visualizaron con un trans-iluminador de luz UV, el que permitió fotografiar el resultado para su posterior análisis.

### **2.2.2.- Bioseguridad.**

Para llevar a cabo el proyecto fue necesario la utilización de la siguiente protección: delantal, mascarillas, guantes y mangas desechables, gabinete de bioseguridad, alcohol yodado como desinfectante/antiséptico. Asimismo, para observar los patrones de bandas fue necesario el uso de lentes con protección UV.

Con respecto a la eliminación de residuos contaminados, aquellos de tipo sólido se esterilizaron en autoclave en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para su posterior eliminación en contenedores de basura del mismo recinto.

## **3.- RESULTADOS**

### 3.1. Diagnóstico fenotípico

Del total de muestras obtenidas tanto de la zona central (50) y sur (100), veinticuatro de éstas mostraron características concordantes con *E. coli* (20) y (4), respectivamente. Esto último quiere decir, que presentaron colonias rojas con halo turbio en agar Mac Conkey, mientras que en las otras muestras se visualizaron características concordantes con otros agentes biológicos tales como *S. aureus*, *Streptococcus* spp., levaduras, etc., los que no son relevantes en el presente trabajo. Los resultados de la pruebas bioquímicas para el diagnóstico de *E. coli* según sus propiedades metabólicas, demostraron ser positiva a esta bacteria en todos los casos, es decir, en la prueba triple azúcar hierro (TSI) las 24 cepas mostraron la capacidad de fermentar glucosa, lactosa y sacarosa, al igual que descarboxilar lisina (LIA). En este mismo sentido, en todos los casos hubo producción de indol, ausencia de carbonato en la prueba citrato de Simmons y producción de urea.

### 3.2. Diagnóstico molecular

Los resultados del PCR para la amplificación de la región espaciadora del rDNA (16s-23s) de *E.coli* aplicado al total de las muestras positivas a las pruebas fenotípicas, mostraron un cien por ciento de concordancia con estos resultados. En este caso, las 24 muestras amplificaron según lo esperado para *E. coli*.

### 3.3. Determinación genes asociados a factores de virulencia

Del total de muestras (24) y del total de genes codificantes evaluados (5), solo dos de éstos se detectaron (*lpf*, *pap*), y tres no fueron encontrados en ninguna del total de muestras (*efa1*, *sfa*, *eae*). En el caso del gen para la fimbria polar larga (*lpf*) se encontró en dos de las muestras, al igual que el gen *pap*, que codifica para la fimbria P. Esto se resume en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Las casillas marcadas corresponden al gen encontrado y la muestra correspondiente.

Factores virulencia	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24
fimbria polar larga ( <i>lpf</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-
intimina ( <i>eae</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fimbria S ( <i>sfa</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fimbria P ( <i>pap</i> )	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-
Adhesina ( <i>efa1</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 4. DISCUSIÓN

El uso de la región espaciadora del rDNA 16s-23s, al igual que el uso del rDNA 16s, son metodologías de identificación moleculares con múltiples ventajas, entre las cuales destacan la identificación de bacterias de difícil cultivo, la descripción de nuevos patógenos y/o la identificación de cepas con escasa descripción, con baja frecuencia de aislamiento o fenotípicamente atípicas (Bou *et al.*, 2011). Si bien estas características no corresponden a *E. coli*, en la cual se ha y sigue utilizando el diagnóstico fenotípico para su identificación, tal como se realizó en este ensayo, la identificación molecular es una herramienta de gran utilidad al complementar la identificación fenotípica de bacterias. Asimismo, existen desventajas importantes del uso por sí sólo de esta herramienta enfrentada en este estudio. Estos hacen relación a la gran homología en las secuencias del ARNr de *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae* (Bou *et al.*, 2011), las que pueden ser diferenciadas a través de características metabólicas de ambas bacterias, como es la fermentación de azúcares. Por otro lado, la sola presencia de material genético de una bacteria en las muestras de leche, no indica que el origen del cuadro de mastitis sea atribuido al agente en cuestión, siendo en éste caso *E. coli*.

A nivel nacional, como se mencionó anteriormente, no existen estudios actuales que revelen el estado epidemiológico de los diferentes agentes causantes de la mastitis bovina, y con ello, como las diferentes medidas de prevención influyen y han influido en la distribución de agentes biológicos. Asimismo, la información científica respecto a la presencia de factores de virulencia

y genes codificantes involucrados en patogenicidad de *E. coli* en la glándula mamaria es inexistente en el país. Si bien el presente trabajo abordó el estudio de cepas patógenas y los factores relacionados a la adhesión en la glándula mamaria, con la finalidad de incluir aquellas positivas a estos factores en una vacuna contra mastitis bovina, resulta fundamental ampliar ensayos epidemiológicos hacia genes codificantes de resistencia antimicrobiana, debido al gran uso de éstos por parte del sector lácteo.

Por otro lado, en distintos lugares alrededor del mundo, existen diversos estudios sobre la prevalencia de factores de virulencia, principalmente asociados a toxinas, en muestras de mastitis clínica, los cuales no han sido concluyentes. Kaipainen *et al.* (2002) determinaron a través de muestras de mastitis bovina de dos países, Finlandia e Israel, que la mayoría de los genes de virulencia evaluados por ellos (*trtA*, *cnf2*, *cnf1*, *aer*, *f17*, *sfa*, *pap*, *afa8d*, *afa8e*, *k1* y *k5*) no se encontraban, o representaban un porcentaje muy bajo. Asimismo, no se encontraron factores de virulencia específicos o patotipos con una habilidad especial para inducir la mastitis entre *E. coli* aisladas. En esa misma línea, Dogan *et al.* (2006) arrojó resultados consistentes con la ausencia de los genes de virulencia, *stx1* *stx2*, *cnf1*, *cnf2*, y *eae*, vista anteriormente en otros trabajos, en la mayoría de las mastitis asociadas a *E. coli* en su estudio. La información obtenida en el presente trabajo fue semejante a los estudios realizados en el extranjero, en donde un 17% de las muestras arrojó positivo al menos a un gen codificante, y en ninguno de los casos dos o más genes fueron encontrados en alguna de las muestras del ensayo, esto pese a los moderados y graves estados de inflamación en los sujetos de estudio. Lo anterior podría sugerir que ninguno de los factores de virulencia evaluados resultaría esencial para la adhesión, como paso importante en la patogenicidad de *E. coli* en el epitelio mamario, a diferencia de factores como el período del peri parto, la etapa de la lactancia, el número de partos, alteraciones metabólicas-hormonales, y el balance energético negativo, los que pueden afectar la función de los leucocitos poliformonucleares (PMN) (Burvenich *et al.*, 2003), y con ello, disminuir la eficiencia bactericida de éstas células en la sangre y en la glándula mamaria de la vaca lechera, causando los moderados a graves estados de la enfermedad. Finalmente, y tomando en cuenta el conjunto de información publicada, aún no existe asociación entre los factores de virulencia y la severidad de la mastitis (Lehtolainen *et al.*, 2003; Wenz *et al.*, 2006).

Es importante destacar que *E. coli* no produce factores de virulencia continuamente, sino que sólo cuando recibe señales específicas del entorno (China y Goffaux, 1999). Desde este punto de



vista, es fundamental como proyección de este estudio considerar no solo la presencia del gen codificante, sino además la expresión del factor de virulencia en superficie. Faleiro (2010) evaluó la presencia de factores de adhesión, entre ellos fimbria P, demostrando la presencia fenotípica de ésta en el 50% de las cepas positivas al gen *pap*, encargado de su codificación. Esto toma mayor relevancia al considerar el uso de estas cepas como antígeno, ya que los factores de adhesión cumplen su función a nivel de la superficie bacteriana y muchos de éstos toman contacto directo con el sistema inmune del hospedero.

## **5-. CONCLUSIÓN**

Los resultados presentados anteriormente, sugieren que *Escherichia coli* continuaría siendo una bacteria de gran impacto productivo en predios lecheros con estabulación, tal como lo han reportado otros autores. Esto manifestado en la gran cantidad de cuadros de mastitis bovina clínica y subclínica causados por este agente biológico, y encontrados en el presente ensayo. En este mismo sentido, los genes codificantes de factores de adhesión evaluados, mostraron no ser relevantes en la producción de los cuadros de mastitis bovina del estudio, sugiriendo la importancia de otros genes de este tipo, involucrados en la etapa inicial del proceso infeccioso de *E. coli* en la ubre, como lo es la adherencia al epitelio mamario.

Finalmente resulta fundamental profundizar el estudio de la patogenia de esta bacteria en la glándula mamaria, cuyos efectos resultan en la enfermedad que genera más costos en la industria láctea mundial, como lo es la mastitis bovina y en donde este coliforme juega un rol muy relevante.

## BIBLIOGRAFÍA

- **BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUFIOA, F.; JUHREZ, A.; BLANCO, J.** 1997. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res. Microbiol.* 148, 745-755
- BOU, G.; FERNÁNDEZ-OLMOS, A.; GARCÍA, C.; SÁEZ-NIETO, J.A.; VALDEZATE, S.** 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29(8):601–608.
- BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L.** 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521-564.
- CHINA, B. y GOFFAUX, F.** 1999. Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30, 181–202.
- CONCHA, C.** 2007. Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. Santiago. Chile. . U. Chile, Fac. Cs. Agronómicas, Depto. Producción Animal. (Serie Apuntes Docentes N° 33).
- DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P.; SIMPSON, K.; SCHUKKEN, Y.H.** 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 116, 270–282.
- DOGAN, B., RISHNIW, M., BRUANT, G., HAREL, J., SCHUKKEN, Y., SIMPSON, K.,** 2012, Phylogroup and *lpfA* influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 159, 163-70.
- FALEIRO, P.L.** 2010. Formación de biopelículas por “*escherichia coli*” y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Memoria para optar al grado de doctor. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de farmacia. 88 – 91p
- FORBES, B.; SAHM, D.; WEISSFELD, A.** 2009. Diagnóstico Microbiológico de Bailey y Scott. (12a ed.) Buenos Aires: Médica Panamericana.
- GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiol.* 142, 3-16.
- HIGGINS, L. M.; FRANKEL, G.; CONNERTON, I.; GONÇALVES, N.S.; DOUGAN, G.; MACDONALD, T.T.** 1999. Role of Bacterial Intimin in Colonic Hyperplasia and Inflammation. *Science* 285, 588–591
- HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.** 2001. **In:** 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. Vancouver, BC, Canada. September 13 - 15 , 2001. National Mastitis Council/American Association of Bovine Practitioners. 1 p.
- JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B.** A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 7839–7843

- KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, SHPIGEL, N. Y., SHWIMMER, A., PYORALA, S., PELKONEN, S.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 85, 37-46 .
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*: 2, 123-40.
- KLAPPROTH, J. M.; SCALETSKY, I.C.; MCNAMARA, B.P.; LAI, L.C.; MALSTROM, C.; JAMES, S.P.; DONNENBERG, M.S.** 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect. Immun.* **68**, 2148–2155.
- KRUZE, J.**1988. Mastitis: efectos en producción y calidad de leche. In: 1er. Seminario de Producción Animal (Bovinos de Carne y Leche). Temuco, Chile. 22-23 Noviembre 1988. s.p.
- LE BOUGUENEC, C.** 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 471–478.
- LEHTOLAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; PYÖRÄLÄ. S.; PELKONEN. S.** 2003. Association Between Virulence Factors and Clinical Course of *Escherichia coli* mastitis. Brief communication. *Acta Vet. Scand.* 44, 203-205.
- LEHTOLAINEN, T.** 2004. *Escherichia coli* mastitis: Bacterial factors and host response. Doctoral thesis. Helsinki, Finland. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. 11-13.
- LOHUIS, J.A.; VERHEIJDEN, J.H.; BURVENICH, C.; VAN MIERT, A.S.** 1988. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 2. Metabolic aspects, *Vet. Q.* 10, 177–125
- NICHOLLS, L.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M.** 2000 Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolated of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35: 275-88.
- OSTERAS, O.; SOLVEROD, L.; REKSEN, O.** 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *J. Dairy Sci.* 89, 1010-1023.
- PHILPOT, W.N.** 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. **In:** Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores. Osorno, CL. 6-8 Diciembre 1999. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias; UFOCO S.A. p. 49-84.
- PYÖRÄLA, S.; TAPONEN, S.** 2009. Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134 (1-2), 3-8. Elsevier.
- SAN MARTÍN, B.; KRUZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOSA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región Metropolitana y X Región, Chile. *Arch. Med. Vet.* 34(2), 221-224.
- SOTO, G.E.; HULTGREN, S.J.** 1999. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.* 181(4):1059-71.

- SCHMIDT H, BEUTIN L, KARCH H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 63: 1055-61
- TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F.R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J.B. 2002. Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 70, 5416-27.
- TORRES, A. G.; KANACK, K. J.; TUTT, C. B.; POPOV, V.; KAPER, J. B. 2004. characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *e. coli* strains. Fems Microbiol. Lett. 238, 333–344.
- WENZ, J.R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F.B.; ELLIS. R. P.; MAGNUSON, R. J. 2006. *Escherichia coli* Isolates serotypes, genotypes and virulence genes and clinical Coliform mastitis severity. J. Dairy Sci. 89: 3408-341.
- YAMAMOTO, S.; TERAI, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 12:85-90.
- YU, J.; KAPER, J.B.1992. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol. Microbiol. 6:411–417.

## ANEXOS

### 1. Adhesinas, factores de adaptación y colonización de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004)

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Acción</b>
Intimina	Adhesina / Induce respuesta Th1
Dr	Adhesina / se une al factor acelerador de la degradación (DAF) / activan PI-3-quinasa e inducen MICA)
Afa, CFAs, Saa, Omp A, Fimbria S y P, LPF y Efa1	Adhesina
Curli	Adhesina / se une a fibronectina
Chu	Captador de hierro/ transportador del grupo hemo
Aerobactina/Yerseniabactina	Sideróforos / captación de fierro
Flagelina	Promueve la motilidad bacteriana

### 2. Toxinas de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004).

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Acción</b>
LPS	Inducen la expresión de citoquinas
Enterotoxinas LT/ST	Ribosilan el ADP, activan guanilato ciclasa.
Shiga toxinas	Depurinan DNA, inhiben la síntesis proteica e inducen apoptosis.
Toxina CDT	Actividad DNAasa, bloqueadoras mitosis
CNF1 y CNF2	Alteran citoesqueleto celular y inducen necrosis
Toxinas HlyA y Ehx	Inducen lisis celular
Stc	Interrumpe la cascada del complemento

### 3. Secuencias de partidores asociados a genes de adhesión, adaptación y daño de *E. coli*.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia directa partidor</b>	<b>Secuencia reversa partidor</b>	<b>Tamaño amplicon</b>
Efa1 (1) <b>Adhesión</b>	AAC TAT CCT GCC GCC TCA GA	GCC TGC GAT AAC AGC ATC AA	456 pb
Lpf (2) <b>Adhesión</b>	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	TACGGGTTATGC CTGCAAGTTCAC	276 pb
Pap (3) <b>Adhesión</b>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATC AT	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGA CA	336 pb
Sfa (4) <b>Adhesión</b>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTT AC	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGG CA	410 pb
Eae (5) <b>Adhesión</b>	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	425 pb
Hly <sub>a</sub> (6) <b>Toxina</b>	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCA C	569 pb
ITs (7) <i>E. coli</i>	GATTAGATACCCTGGTAG	AGTCACTTAACCATACAACCC	2212 pb

<sup>1</sup> (Nicholls *et al.*, 2000).

<sup>2</sup> (Torres *et al.*, 2002).

<sup>3</sup> (Yamamoto *et al.*, 1995).

<sup>4</sup> (Yamamoto *et al.*, 1995).

<sup>5</sup> (Yu y Kaper, 1992).

<sup>6</sup> (Schmindt *et al.*, 1995).

<sup>7</sup> (Gürtler y Stanisich, 1996)