



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA



---

---

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE  
*Staphylococcus aureus* DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE Y  
DE HUMANOS DEL MUNICIPIO DE TARÍMBARO MICHOACÁN**

Tesis que presenta

MVZ. DANIELA ANGEL ANDRÉS

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Opción en

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

Tutor

D. C. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN

Co- Tutor

D. C. VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

MORELIA, MICHOACÁN; ENERO DE 2012.

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de D. C. Juan José Valdez Alarcón. Durante la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de la Coordinación de la Investigación Científica de la U.M.S.N.H. (proyecto C.I.C. No. 14.7-2008) y del CONACYT (proyecto No. 56741).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan José Valdéz Alarcón por confiar en mí desde el primer momento. Por guiar mi trabajo, y mostrarme que a base de dedicación y constancia se logran las metas. Le agradezco su amistad con la que me enseñó que el obstáculo más grande para llegar al éxito somos nosotros mismos.

Al Dr. José Luis Solorio Rivera por participar en el diseño experimental del estudio. Por sus comentarios durante la realización del trabajo, por sus palabras de motivación y por supuesto por su amistad.

Al Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre, por compartirnos su conocimiento a través de sus comentarios que contribuyeron a darle un enfoque integral a esta tesis.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio por sus valiosos comentarios durante el desarrollo de mi proyecto y por su disposición para formar parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Alejandro Bravo Patiño por su apoyo durante la parte experimental y escritura de la tesis.

Al Dr. Marcos Cajero Juárez por su apoyo económico y moral para la realización de este proyecto.

A la QFB. Irma Rentería Solórzano por brindarme su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Bacteriología de la USAD.

A los Maestros Saúl Ignacio Carranza Germán, José Luis Carlos Bedolla Cedeño y Rosalva Mejía Alfaro, por el apoyo técnico que aportaron al desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.

A Daisy y Nadia por motivarme a cada momento. Por ser más que mis amigas, ser mis hermanas.

A Octavio (mi chaparrito, Tláloc, Zeus, Chapulín, mi amor y lo que se acumule), por todo lo que compartimos, por tus consejos y comentarios acertados, por tu apoyo incondicional, tu cariño y la energía que inyectas a mi vida día a día.

A mis amigas Ale, Caro, Dorian, Eli y Nayeli por cada momento juntas, por sus consejos y regaños.

A mis compañeros del CMEB, Uriel, Huante, Richy, Claudia, Humberto, Indhira, Luigüi, Elvira, Meli, Ramón, Yadi, Moy y Carlos, por hacer las horas de trabajo más amenas.

## **DEDICATORIA**

A Dios, que a través de mi familia, está siempre presente en mi vida.

A mis padres J. Santos Angel Urbina (Don Santos) y Ma. Carmen Andrés Zaldívar (Karla), artesanos de mi pasado, presente y futuro, por su amor incondicional, motor que impulsa cada una de mis acciones.

A mis hermanos Luis Felipe (enano), Lidia (yiya), Nora (mama), por ser mis amigos, compañeros y cómplices de toda la vida, por apoyarme en todos mis proyectos, por sus consejos, abrazos y besos en los momentos más vulnerables de mi vida.

A mis sobrinos Adrián (sito), Samantha (sami), Sheila (chei) y el bebé en camino, por sus sonrisas y travesuras inocentes, luz que ilumina el camino hacia mis sueños y metas.

A mis cuñados Rocío, Leopoldo y César, por ser parte de mi familia.

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b><i>arcC</i>,</b>	Carbamato-cinasa
<b>ARNr,</b>	ARN ribosomal
<b><i>aroE</i>,</b>	Shiquimato-deshidrogenasa
<b>AS,</b>	Agar Sangre
<b>CAD,</b>	Cuarto Anterior Derecho
<b>CAI,</b>	Cuarto Anterior Izquierdo
<b>CC,</b>	Complejo Clonal
<b>CCS,</b>	Cuenta de Células Somáticas
<b>CLSI,</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b><i>coa</i>,</b>	Región 3' del gen de la coagulasa de <i>S. aureus</i>
<b>CPD,</b>	Cuarto Posterior Derecho
<b>CPI,</b>	Cuarto Posterior Izquierdo
<b>CSA,</b>	CHROMagar™ Staph. aureus
<b>DLV,</b>	Variante de Doble <i>loci</i>
<b>dN,</b>	Sustituciones No Sinónimas
<b>DS,</b>	Desviación Estándar
<b>dS,</b>	Sustituciones Sinónimas
<b><i>glpF</i>,</b>	Glicerol-cinasa
<b><i>Gmk</i>,</b>	Guanilato-cinasa
<b>Hd,</b>	Heterogosidad
<b>IC,</b>	Intervalo de Confianza
<b>MC,</b>	Mastitis Clínica
<b>MLST,</b>	Caracterización Mediante Secuencias Multilocus
<b>MRI,</b>	Aislado asociado a mastitis
<b>MS,</b>	Mastitis Subclínica
<b>Na,</b>	Alelo Nuevo
<b>NST,</b>	Secuencia- Tipo Nueva
<b>OR,</b>	Razón de Momios
<b><i>P</i>,</b>	Probabilidad
<b>PBP2a,</b>	Proteína de Unión a Penicilina
<b>PCR- RFLP,</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa- Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
<b>PFGE,</b>	Macrorestricción en Electroforesis de Campos Pulsados
<b><i>pta</i>,</b>	Fosfo-acetil transferasa
<b>PVL,</b>	Leucocidina de Panton-Valentine
<b>RAPD,</b>	Amplificación de ADN Polimórfico al Azar
<b><i>S. aureus</i>,</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>S110,</b>	Agar Staphylococcus-110

<b>SARM,</b>	<i>S. aureus</i> Resistente a Meticilina
<b>SARM-AC,</b>	<i>S. aureus</i> Resistente a Meticilina Adquirida en la Comunidad
<b>SARM-AH,</b>	<i>S. aureus</i> Resistente a Meticilina Adquirida en Hospital
<b>SASM,</b>	<i>S. aureus</i> Susceptible a Meticilina
<b>SAT,</b>	Secuencia Satélite
<b>SCCmec,</b>	Cassette Cromosómico Estafilocócico de Resistencia a Meticilina
<b>SLV,</b>	Variante de Un <i>locus</i>
<b>ST,</b>	Secuencia- Tipo
<b>TLV,</b>	Variante de Triple <i>loci</i>
<b>TMCA,</b>	Tasa Media de Crecimiento Anual
<b><i>tpi,</i></b>	Triosa-fosfato isomerasa
<b>TSST-1,</b>	Toxina 1 de Síndrome de Choque Tóxico
<b>UPG,</b>	Unidad de Producción Ganadera
<b><i>yqiL,</i></b>	Acetil coenzima A-acetil transferasa
<b><math>\pi,</math></b>	Índice de diversidad nucleotídica

## CONTENIDO

### LISTA DE ABREVIATURAS

I. RESUMEN GENERAL	1
II. SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1. ANTECEDENTES	3
1.1. La leche como alimento	3
1.1.1. La leche como materia prima para la elaboración de productos lácteos	3
1.2. Situación de la producción lechera en México	4
1.2.1. Sistemas de producción lechera	5
1.3. Producción lechera en Michoacán	6
1.3.1. La situación del municipio de Tarímbaro	7
1.4. Problemas sanitarios de la producción lechera	7
1.5. Epidemiología de la mastitis bovina	8
1.5.1. Mastitis subclínica	8
1.5.2. Mastitis clínica	8
1.5.3. Factores de riesgo asociados a la prevalencia de mastitis	9
1.5.4. Agentes biológicos causales de mastitis	9
1.5.4.1. Contagiosos	9
1.5.4.2. Ambientales	10
1.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.6.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	12
1.6.2. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	13
1.7. Caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.8. Epidemiología	15
1.8.1. Epidemiología clásica	15
1.8.2. Epidemiología molecular	18
1.8.3. Caracterización mediante secuencias multilocus (MLST)	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	23



V. OBJETIVOS	23
a. General	23
b. Particulares	23
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
a. Capítulo 1	26
b. Capítulo 2	52
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	75
IX. CONCLUSIONES GENERALES	78
X. PERSPECTIVAS	79
XI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	80
APÉNDICE	89

## I. RESUMEN GENERAL

La industria lechera es una actividad económica importante en el estado de Michoacán. La diseminación de *Staphylococcus aureus* es un grave problema de salud pública, ya que es el principal agente causal de mastitis bovina e infecciones nosocomiales y de comunidad abierta en humanos. Su control y tratamiento han fracasado, debido a la diversidad de cepas existentes y a la ubicuidad del microorganismo. En este trabajo se caracterizaron molecularmente aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas con mastitis y de humanos involucrados en la producción lechera del municipio de Tarímbaro, Michoacán. El estudio se realizó en 13 granjas familiares. La prevalencia de mastitis fue del 44.58% (subclínica 42.03%, clínica de 2.54%). Mediante el análisis de secuencias multilocus (MLST) se identificaron 6 Secuencias Tipo (STs) reportados y, 4 alelos (Nas) y 12 STs nuevos (NSTs). El NST-4 fue el ST más ubicuo, ya que se identificó en aislados de *S. aureus* de origen bovino, humano y fomite. La mayoría de los aislados de bovino y un aislado de humano se agruparon en el complejo clonal 97 (CC97) reportado como asociado a bovinos. Se encontraron dos aislados de bovinos con ST8, la cual se ha reportado como asociada a infecciones de comunidad en humanos. Análisis de distribución de las cepas sugieren que el NST-4 se comporta como la clona fundadora de la cual se derivan varios de los NSTs encontrados en bovinos. Estos hallazgos sugieren una transmisión entre hospederos, representando un riesgo para la salud pública. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre genotipos específicos de coagulasa y/o STs y la forma de presentación de mastitis. Los genotipos asociados a mastitis subclínica fueron aquellos con alotipos A y D del gen *coa* y ST1476 y, en el caso de mastitis clínica los genotipos con alotipo B del gen *coa* y los STs 188, NST-1 y NST-12.

## II. SUMMARY

Milking industry is one of the main economical activities in Michoacán. However, important losses have been quantified due to bovine mastitis. Dissemination of *Staphylococcus aureus* is considered a public health problem because it has been associated with bovine mastitis, mainly, in animals, but it also causes community- and hospital-acquired infections in humans. The diversity and environmental adaptation of *S. aureus* strains had lead to failure in successful control and treatment. In this work *S. aureus* isolated from mastitic cows and humans working in the milk production system in the municipality of Tarímbaro, Michoacán were subject to molecular characterization. 13 backyard farms were analyzed. The prevalence of mastitis was 44.58% (subclinical 42.03, clinical 2.54%). From multilocus sequence typing analysis (MLST) 6 reported Sequence-Type (STs), 4 new alleles (Nas) and 12 new STs (NSTs) were identified. The most ubiquitous ST was NST-4. It was identified in isolates from bovine, human and fomites. Most of the bovine isolates and one human isolate were grouped in the Clonal Complex 97 (CC97), associated to bovine. The ST8, which has been associated with community infections in humans, was found in two bovine isolates. The analysis of strains distribution pointed to NST-4 as the founder strain, from which some of the rest NSTs in bovine have evolved. These findings suggest a transmission between hosts. A statistical correlation was found between coagulase and STs genotypes with the grade of mastitis. Genotypes *coa* A and D and ST1476 were related to subclinical mastitis and, in clinical mastitis, genotypes *coa* B and STs 188, NST-1 and NST-12 were involved.

### **III. INTRODUCCIÓN GENERAL**

#### **1. ANTECEDENTES**

##### **1.1. La leche como alimento**

La leche, es la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, y que es posterior a la secreción del calostro (NOM-243-SSA1-2010). La leche para consumo humano debe ser sometida a tratamientos térmicos como la pasteurización u otros procesos que garanticen su inocuidad, además de ser sometida a operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras que cumplan con las especificaciones de su denominación (NOM-155-SCFI-2003). La leche de vaca se compone de 3.5% de proteína (caseína 2.8% y seroproteínas como la  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, entre otras, 0.7%), 3.7% de grasa, 4.8% de carbohidratos y 0.7% de cenizas) (Madrid, 2003).

##### **1.1.1. La leche como materia prima para la elaboración de productos lácteos**

Se considera a la leche como el alimento natural más completo, por proveer cantidades significativas de compuestos esenciales para la nutrición. Esto facilita su contaminación a partir de agentes ambientales, como del propio animal, el ordeñador o bien el equipo utilizado en el ordeño. Para asegurar la salud del consumidor, la leche debe de ser obtenida de vacas sanas y procesarse en condiciones higiénicas y sanitarias.

Los derivados lácteos son una gama de productos que se obtienen al someter la leche a determinados procedimientos tecnológicos. Al igual que la leche, deben de cumplir con características microbiológicas establecidas en las normas sanitarias, ya que estos productos son consumidos por la sociedad (Arrieta, 2011). El consumo de quesos artesanales, elaborados por estrategias sin tratamientos térmicos, incrementa el riesgo de infección y/o

intoxicación por estafilococos, *Staphylococcus aureus*, principalmente (Vautor *et al.*, 2005).

## **1.2. Situación de la producción lechera en México**

El sector productivo primario mexicano, se caracteriza por su heterogeneidad tanto productiva como económica, que de cierta forma refleja la amplia distribución productiva en sus regiones. En una misma zona se encuentran sistemas de producción que cuentan con un desarrollo tecnológico avanzado, caracterizado por un desarrollo genético, biotecnológico, manejos computarizados y un amplio desarrollo de mercados, en coexistencia con numerosas unidades de producción familiar, que se caracterizan por un desarrollo tecnológico desigual y con poco desarrollo de mercado. La heterogeneidad en los sistemas de producción, conlleva a que una parte del sector productivo primario lechero continúe enfrentando problemas de calidad en la producción y como consecuencia, en la comercialización y rentabilidad (Villamar y Olivera, 2005).

Durante el 2009, la producción nacional de leche de bovinos fue de 10,549 millones de litros, lo cual representó un decremento (del 0.38%) con respecto a la producción del año 2008. En los últimos 10 años la Tasa Media de Crecimiento Anual (TMCA) ha presentado un incremento de 1.74% (SAGARPA, 2010).

En cuanto a la distribución geográfica de la producción, en el 2009 se concentró en 9 entidades federativas, que aportaron en conjunto el 74.2% del total nacional. Se consolidaron como principales estados productores de leche, Jalisco con 18% del total de la producción, la Región Lagunera (Coahuila y Durango) con 21.3%, Chihuahua con 8.8%, seguido por Veracruz, Guanajuato, México, Hidalgo y Puebla (SAGARPA, 2010).

### **1.2.1. Sistemas de producción lechera**

#### ***Sistema intensivo o especializado***

Consiste en un establo con ganado especializado para la producción de leche, principalmente de las razas Holstein y en menor medida de las razas Pardo Suizo y Jersey. Estos sistemas cuentan con tecnología altamente especializada. El manejo del ganado es predominantemente estabulado y la dieta se basa en forrajes de corte y alimentos balanceados. La ordeña es mecanizada y la producción se destina principalmente a las plantas pasteurizadoras y transformadoras. El tamaño promedio de las unidades de producción es de 589 vacas, las cuales producen 5940 litros de leche (Odermatt y Santiago, 1997). Aporta el 50.6% de la producción total nacional de leche (Villamar y Olivera, 2005).

#### ***Sistema semi-intensivo***

Predomina el ganado de las razas Holstein y Pardo Suizo y los niveles de producción son menores que para el sistema especializado. El ganado se mantiene en condiciones de semiestabulación desarrollada en pequeñas extensiones de terreno; la ordeña puede ser manual o mecanizada, en ordeñadoras individuales o de pocas unidades; mantiene un nivel medio de tecnología y en ocasiones se cuenta con algunos sistemas de enfriamiento aunque no es lo común. Contribuye con el 21.3% de la producción total de leche en el país (Villamar y Olivera, 2005).

#### ***Sistema familiar***

Esta actividad se limita a pequeñas extensiones de terreno y cuando se ubican cerca de la vivienda se denomina de traspatio. Las razas varían entre Holstein, Suizo Americano y sus cruza; la alimentación se basa en el pastoreo o en el suministro de forrajes y esquilmos provenientes de los cultivos que se producen en la misma granja. Este sistema produce el 9.8% de la producción total nacional de leche (Villamar y Olivera, 2005). El tamaño promedio de la unidad de producción es de 16 vacas, aunque puede llegar a 30 (Sánchez *et*

*al.*, 2007). La producción de leche diaria de leche promedio por vaca es de 9 litros. Aunque la aportación nacional es reducida, la importancia de este tipo de sistemas es que ha demostrado su sustentabilidad económica (Espinoza *et al.*, 2004).

### ***Sistema de doble propósito***

Dentro de este sistema predominan las razas Cebuinas y sus cruzas. En este sistema el ganado sirve para la producción tanto de carne como de leche. El manejo del ganado se da en forma extensiva, confinándose a los corrales solo durante la noche, su alimentación se basa en el pastoreo e incluye un mínimo de complementos en alimentos balanceados. La ordeña es manual. Produce el 18.3% del volumen total de leche en el país (Villamar y Olivera, 2005).

### **1.3. Producción lechera en Michoacán**

La ganadería como actividad productiva es eminentemente un sistema de economía familiar y base sociocultural de una amplia población campesina en Michoacán. En el Estado se cuenta con 62,545 productores ganaderos, con una edad y escolaridad promedio de 56.6 años y 3.6 años respectivamente (INEGI, 2010). Las Unidades de Producción Ganadera (UPG) ocupan una superficie de 2'972,570 hectáreas, de las cuales el 85% son dedicadas a la ganadería, el 14% a la agricultura y el 1% restante a otras actividades. El promedio general del tamaño del predio de las unidades de producción ganadera es de 47.5 has.

La media estatal es de 25.6 cabezas por UPG (SAGARPA, 2004). Las cifras anteriores destacan que gran parte de la ganadería del estado está desarrollada por pequeñas unidades de producción, operadas por población principalmente campesina donde la ganadería constituye parte de su sistema de economía familiar y base sociocultural. La ganadería es la actividad que genera más empleo permanente en el sector primario del Estado de Michoacán. Las UPGs ocupan 100,608 empleos permanentes y generan 1'436,294 empleos eventuales, si consideramos que 240 días de empleo eventual corresponden a un empleo permanente, esto equivaldría a 5,984 empleos permanentes (INEGI, 2004).

Michoacán cuenta con dos cuencas de importancia para la producción de leche bovina, en donde el sistema de producción es de lechería familiar. La de mayor importancia es La Ciénega de Chápala y la segunda se encuentra en el Valle Morelia-Queréndaro, cerca de la capital del Estado (Angel y Díaz, 2007). Esta última es la que provee directamente de leche y productos lácteos artesanales a la capital del Estado.

### **1.3.1. La situación del municipio de Tarímbaro**

Tarímbaro es uno de los municipios cercanos a la ciudad de Morelia. Los sistemas de producción del municipio de Tarímbaro, son unidades pequeñas de producción, considerados como granjas familiares o de traspatio cuyas características principales son el manejo centrado en los integrantes de la familia, ubicadas en los corrales o traspatios de los poblados, con inversiones bajas y construcciones rústicas, obtención y venta de leche bronca sin ningún control sanitario y la ordeña es principalmente manual (Magaña y Montañez, 2005). El municipio de Tarímbaro produce 12,157 litros de leche al año (SIAP, 2009).

### **1.4. Problemas sanitarios de la producción lechera**

Las enfermedades son un factor que impacta directamente en la productividad, comercialización y rentabilidad de la ganadería del Estado de Michoacán, debido a su efecto sobre la reproducción, el desarrollo del ganado, los índices de mortalidad y desecho, la producción de leche y su calidad, así como la imposibilidad de acceder a mercados de alto valor (Sánchez y Sánchez, 2006). Las principales enfermedades de importancia sanitaria incluidas en los programas de vigilancia epidemiológica nacionales son la tuberculosis y la brucelosis bovina. La mastitis bovina por su parte, es la que mayores pérdidas económicas causa a la industria lechera.



## **1.5. Epidemiología de la mastitis bovina**

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria caracterizada por alteraciones patológicas del epitelio glandular mamario, las cuales se reflejan en cambios físicos y químicos de la leche. La magnitud de las lesiones y de la pérdida de productividad láctea, así como la claridad de los síntomas de inflamación, constituyen las bases para el diagnóstico clínico (Castro *et al.*, 2006).

### **1.5.1. Mastitis subclínica**

Esta ocurre cuando un patógeno infecta uno o más cuartos pero no causa daño suficiente en los alveolos para que produzca cambios significativos en la calidad de la leche. En estos casos el sistema inmune de la vaca responde a la invasión bacteriana con el incremento en el número de leucocitos en el cuarto, mismos que deben ser puestos de manifiesto mediante pruebas cualitativas como la Prueba de California para la mastitis, o cuantitativas como el Conteo de Células Somáticas.

La mastitis subclínica es entre 10-40 veces más frecuente que la clínica, a la cual usualmente precede. En muchos casos, tiene una alta prevalencia, lo que repercute en una pérdida aproximada de \$344.20 pesos por vaca por año productivo de 305 días en lactación (Philpot, 1999; Hogeveen *et al.*, 2011).

### **1.5.2. Mastitis clínica**

La mastitis clínica se caracteriza por presentar alteraciones fácilmente detectables, como cambios en el color de la leche, pudiéndose presentar desde amarillenta hasta rojiza, cambios en su sabor, cambios en la consistencia presentándose cremosa o espesa acompañada de coágulos y/o tolondrones y/o natillas. A la palpación podemos detectar cambios en el parénquima glandular detectándose caliente, firme, dura y los animales pueden presentar fiebre, taquicardia, polipnea, anorexia y, atonía (Cano, 2001).

### **1.5.3. Factores de riesgo asociados a la prevalencia de mastitis**

No sólo los microorganismos son responsables de la mastitis, ya que en realidad la enfermedad es el resultado de la interacción de varios factores, entre los cuales destacan: la higiene y el manejo de los animales (especialmente durante la ordeña) las características del ambiente productivo, susceptibilidad individual de las vacas (Philpot, 1999). Se han reportado al menos 140 microorganismos como posibles agentes causales de la mastitis bovina, la mayoría de los cuales son de difícil erradicación (Philpot, 1999). La mastitis también puede ser causada por agentes físicos (traumatismos con algún objeto punzocortante, por ejemplo) (Radostis *et al.*, 2002).

El ganado estabulado se encuentra en mayor riesgo que el ganado en pastoreo. Las condiciones que incrementan la densidad del ganado, como las áreas techadas, pueden contribuir al aumento de patógenos (Fox, 2002).

### **1.5.4. Agentes biológicos causales de mastitis**

Los agentes causales pueden ser clasificados como contagiosos y ambientales, dependiendo de su reservorio primario.

#### **1.5.4.1. Contagiosos**

Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario es el animal infectado o el cuarto de la ubre, pero también se ha aislado de las instalaciones y el equipo, alimento, otros animales y humanos (Boost *et al.*, 2007; Bradley, 2002; Cuny *et al.*, 2006, Roberson *et al.*, 1994; Rossitto *et al.*, 2002; Zadoks *et al.*, 2001). Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* (Riffon *et al.*, 2001). La diseminación de la enfermedad ocurre esencialmente durante el ordeño, ya sea mecánico (a través de las máquinas de ordeño) o manual (por la mano del operario), los accesorios de limpieza y

preparación de las ubres, tales como esponjas, toallas o trapos, sirven también como elementos para la propagación de los microorganismos (Castro *et al.*, 2006).

#### **1.5.4.2. Ambientales**

Los patógenos ambientales incluyen a los bacilos entéricos Gram negativos Enterobacterias, principalmente *E. coli* y *Klebsiella spp.*, (Riffon *et al.*, 2001) y *Streptococcus uberis* (Bradley, 2002). Estos pueden contaminar el pezón a través de estiércol, barro y aguas estancadas. Otros accesorios, como pomos intramamarios, agujas, cánulas y jeringas contaminadas, contribuyen a la diseminación de los patógenos ambientales, al igual que alimentos y comederos y materiales orgánicos de las camas (Philpot, 1999).

#### **1.6. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria inmóvil Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia facultativa, catalasa positiva. Produce generalmente la enzima coagulasa, fermenta el manitol y otros azúcares, formando ácido pero no gas. Su crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura (6.5 a 50° C), siendo su temperatura óptima 30- 40° C. Tolera altas concentraciones (7% al 10%) de cloruro de sodio. Se destruye fácilmente por altas temperaturas y por casi todos los agentes desinfectantes, por lo cual la presencia de esta bacteria en alimentos procesados o en equipos indica generalmente higiene deficiente o contaminación post-proceso por causa humana (Castro *et al.*, 2006).

*S. aureus* tiene buena capacidad de colonizar animales, incluyendo mamíferos, reptiles y aves. En humanos, este organismo reside principalmente en las fosas nasales, piel, y ocasionalmente, puede encontrarse como parte de la flora del tracto digestivo y vaginal. Los individuos pueden ser: no portadores (20% de la población), portadores persistentes (20-25%) o bien, portadores intermitentes (55- 60%). El estado de portador es un factor de riesgo en procesos patológicos invasivos (Lindsay, 2008). En México, Hamdan *et al.*,

(2010), determinaron que el 12.6% de las cepas de *S. aureus* aisladas de humanos portadores nasales sanos fueron resistentes a meticilina. Las patologías que causa *S. aureus* en animales son principalmente mastitis (rumiantes y conejos), infecciones de la piel, condronecrosis y artritis séptica, entre otras.

*S. aureus* causa una de las formas crónicas más comunes de mastitis. Aunque algunas vacas cursan con una mastitis clínica de curso rápido (especialmente después del parto), la infección por *S. aureus* es usualmente subclínica, causando conteos elevados de células somáticas sin cambios detectables en la ubre o en la leche. La bacteria persiste en la glándula mamaria, canal del pezón y en las lesiones en pezones de vacas infectadas, siendo muy contagioso. La infección se disemina al momento del ordeño cuando la leche contaminada de una glándula (cuarto) infectado entra en contacto con una glándula no infectada, así la bacteria penetra el canal del pezón. Una vez establecida la infección por *S. aureus*, el tratamiento con antibióticos no es, generalmente, exitoso (Petersson *et al.*, 2010). En algunos hatos con una Cuenta de Células Somáticas (CCS) inferior a 200, 000/ml, no se ha logrado erradicar a *S. aureus* a pesar del uso de buenas prácticas de ordeño (Roberson *et al.*, 1994).

*Staphylococcus aureus* también causa enfermedades en los humanos, algunas adquiridas en la comunidad como dermatitis, infecciones respiratorias, del tracto urinario; otras son adquiridas en hospitales (nosocomiales) como endocarditis infecciosa, osteomielitis, del sistema nervioso central y bacteremias; todas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados (Amorim *et al.*, 2007; Bustos *et al.*, 2006; Dixon, 1995; Enright *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 1992; Zadoks *et al.*, 2000).

También provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome de choque tóxico provocado por la liberación de superantígenos en el torrente sanguíneo (Bustos *et al.*, 2006). Se ha estimado que *S. aureus* presenta un 50% de resistencia a antibióticos, principalmente a la meticilina, es decir, que la bacteria sobrevive al ser combatida con esos fármacos (Cabrera *et al.*, 2002; Cuny *et al.* 2006; Diederer *et al.*

Kluytmans, 2006; Enright *et al.*, 2002), incrementándose así el riesgo en la salud animal y humana.

### **1.6.1. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)**

Las cepas de *S. aureus* involucradas en infecciones nosocomiales son resistentes a múltiples fármacos, principalmente a la meticilina, por lo que generalmente se les denomina como *S. aureus* Resistente a Meticilina (SARM) para distinguirlas de las cepas Sensibles a Meticilina (SASM). En cepas SARM, la adquisición horizontal del elemento genético móvil SCCmec (cassette cromosómico estafilocócico de resistencia a meticilina) que contiene gen *mecA*, le confirió resistencia a meticilina, ya que este gen codifica para la proteína de unión a penicilina (PBP2a), que intrínsecamente hace resistentes a estas cepas a meticilina y otros  $\beta$ -lactámicos (Foster, 2004). De acuerdo a la patología que se presenta estas cepas se dividen en adquiridas en hospital (SARM-AH) y adquiridas en la comunidad (SARM-AC). El aumento dramático en las infecciones por SARM-AH en los últimos años se debe a varios factores, que incluyen: el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, un mayor número de pacientes inmunocomprometidos en los hospitales y una mayor utilización de medios invasivos, como catéteres y sondas, que facilitan la entrada y colonización de cepas SARM a la sangre y tejidos (Bustos *et al.*, 2006). Tras la aparición de cepas SARM en adultos y niños sanos en las comunidades, dio lugar a una nueva clasificación, dónde se definía a las SARM-AC como aquellas cepas resistentes a meticilina que no estuvieran vinculadas con algún tipo de riesgo nosocomial.

El primer aislado de SARM de una fuente no humana, fue de leche de vaca. Subsecuentemente, cepas SARM se han reportado en una amplia variedad de animales domésticos incluyendo perros, gatos, cabras, ovejas, conejos, caballos, cerdos y gallinas (Leonard y Markey, 2008; Lindsay, 2008; Smyth *et al.*, 2007; Smyth *et al.*, 2009).

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

Las cepas de *S. aureus* expresan diversos factores de virulencia (Tabla 1); algunos de estos factores son expresados por genes que se localizan en elementos genéticos móviles como las islas de patogenicidad y los bacteriófagos lisogénicos (Foster, 2004). Bustos *et al.*, (2006) clasifican a estos factores en 1) los involucrados en la adherencia a la célula hospedera o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del hospedero, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST- 1, la leucocidina de Pantone-Valentine (PVL), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares; 3) los involucrados en la invasión de la célula hospedera y penetración de los tejidos, como la toxina  $\alpha$ , hemolisinas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ .

**Tabla 1.** Genes de virulencia de *S. aureus*

FACTOR DE VIRULENCIA	GEN	LOCALIZACIÓN	RELEVANCIA EN PATOGÉNESIS
<i>Exoenzimas</i>			<i>Intervienen en la invasión de tejidos y la evasión de la respuesta inmune del hospedador</i>
• Proteasas de serina	<i>Spl</i>	Isla genómica vSaa	
• Stafilocinasa	<i>Sak</i>	Profago	
• Fosfodiesterasa, stafilocagulasa, lipasas, proteasas de cisteína, proteasas de serina, proteasa de serina V8, termonucleasa, hialuronidasa, aureolisina (proteasa de zinc), hidrolasas, proteasas ClpX	<i>plc, coa, lip, geh, htrA, sspB-C, sspA, nuc, hysA, aur, lytN, clpX</i>	Cromosómica	
<i>Toxinas</i>			
• Exotoxinas/superantígenos	<i>set(s)</i>	Isla genómica vSa $\beta$	Superantígeno
• Leucotoxinas D y E	<i>lukD, E</i>	SaPI	Evasión de defensa celular
• Leucocidinas F y M	<i>lukF, M</i>	SaPI	Evasión de defensa celular
• Leucocidina Pantone-Valentine	<i>lukS, F-PV</i>	SaPI	Evasión de defensa celular
• Toxina 1 de síndrome de choque tóxico	<i>Tst</i>	SaPI	Evasión de defensa celular, superantígeno, causa el síndrome de choque tóxico

• Enterotoxinas	<i>se(s)</i>	Isla genómica vSaβ	Evasión de defensa celular, superantígeno, intoxicaciones alimentarias
• Hemolisinas α, β y δ	<i>hly, hlb, hla</i>	Cromosómica	Invasión tisular
• Hemolisina γ	<i>hlgA, B, C</i>	Cromosómica	Potencia lisis celular
• Toxinas exfoliativas	<i>eta, etb</i>	Cromosómica	Evasión defensa celular, causa escaldaduras en piel
<b>Adhesinas</b>			
• Proteínas de unión a matriz extracelular	<i>ebhA, B</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
• Proteínas de unión a elastina	<i>EbpS</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
• Proteínas de unión a fibronectina	<i>fnbA, B</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
• Proteínas de adhesión intercelular	<i>icaA, B, C, D</i>	Cromosómica	Adhesión intercelular, formación de biopelículas
• Precursor de la adhesina de colágeno	<i>Cna</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
• Factores de agregación	<i>clfA, B</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
• Proteínas ricas en Ser- Asp	<i>Sdr</i>	Cromosómica	Unión a matriz extracelular
<b>Otros</b>			
• Lipoproteínas	<i>lpl(s)</i>	Isla genómica vSau	Interacción celular
• Proteína A	<i>Spa</i>	Cromosómica	Proteína antifagocítica, activa la respuesta inflamatoria
• Proteínas de síntesis del polisacárido capsular	<i>capA- G</i>	Cromosómica	Adhesión intercelular, formación de biopelículas
• Transportador ABC de Ferricromo	<i>FluD</i>	Cromosómica	Transporte de hierro
• Proteína de unión a IgG	<i>Sbi</i>	Cromosómica	Antifagocítica
• Sistema de incorporación de hierro	<i>isdA- G, srtB</i>	Cromosómica	Transporte de hierro

(Adaptada de Baizabal *et al.*, 2009).

## **1.7. Caracterización de *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* puede identificarse convencionalmente por características fenotípicas que le distinguen. Las colonias de *S. aureus* en agar sangre presentan 1 a 3mm de diámetro en un lapso de 24 a 36 horas, pigmentación de crema a naranja, suaves y halo de hemólisis  $\beta$ . De manera atípica, algunas colonias que producen abundante material capsular, son de apariencia brillante y húmeda. *S. aureus* presenta actividad de coagulasa, fosfatasa, catalasa, hemolisinas, gelatinasa y fermentación del manitol (Boerlin *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2007). Sin embargo, esta identificación no es suficiente para establecer estudios epidemiológicos detallados y estrategias de control dirigidas.

Las herramientas de la biología molecular son útiles en la identificación y clasificación de aislados clínicos, y han demostrado tener un alto grado de discriminación entre cepas de *Staphylococcus aureus* (Phuektes *et al.*, 2003), lo que es necesario para estudios de epidemiología, por ejemplo, en la aparición de un brote.

## **1.8. Epidemiología**

### **1.8.1. Epidemiología clásica**

La Epidemiología como ciencia que se ha ido consolidando a lo largo de su historia, se ha estructurado sobre la investigación de los procesos de salud y enfermedad en las poblaciones como un objeto disciplinario propio (Laza, 2006). Se ha definido a la epidemiología como la ciencia que tiene el propósito de describir y explicar la dinámica de la salud poblacional, identificar los elementos que la componen y comprender las fuerzas que la gobiernan, a fin de desarrollar acciones tendientes a conservar y promover la salud de la población (Ávila, 2007).

Uno de los principales objetivos de la investigación epidemiológica es establecer las causas del fenómeno de interés. Una “causa” de enfermedad desde el punto de vista epidemiológico es un evento, condición, característica o una combinación de estos factores



que juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Robert Koch planteó los siguientes enunciados que permiten establecer la asociación causal con un agente patógeno: 1) el agente está presente en un individuo enfermo; 2) es posible cultivar y reproducir al microorganismo asociado; y 3) al inocularlo a un animal sano, éste desarrollará la misma enfermedad. En la actualidad se ha identificado que se requieren aspectos propios del agente, y del ambiente que sólo a través de su interacción pueden producir la enfermedad, si esto sucede, dichas condiciones en conjunto son llamadas *causa suficiente* para la presentación del problema, mientras que el denominado agente causal es por lo regular sólo la *causa necesaria* (Jaramillo y Martínez, 2010).

Cuando se habla de *multicausalidad*, es posible generar hipótesis que permitan determinar el papel que juegan diversas variables que pudiesen estar asociadas con la enfermedad, de esta forma Evans (1976) planteó una serie de postulados que permiten confirmar una relación causal:

- a) Debe haber una proporción significativamente mayor de enfermos entre aquellos individuos expuestos a la supuesta causa con relación a los no expuestos.
- b) Debe haber mayor exposición a la supuesta causa entre los individuos enfermos en comparación con los que no lo están.
- c) La incidencia de la enfermedad deberá ser mayor entre los individuos expuestos en comparación con los no expuestos.
- d) Después de la exposición se espera que la presentación de la enfermedad tenga en principio, periodos de incubación con una distribución similar a la normal.
- e) Las respuestas por parte del hospedero deberán de tener un gradiente de presentación, desde leves a graves de acuerdo con un sentido biológico lógico.
- f) Posterior a la causa debe de aparecer una respuesta con posibilidades de ser medible, esta respuesta no debe encontrarse presente en los individuos no expuestos o no debe ser mayor.
- g) La reducción o eliminación de la exposición a la supuesta causa debe traer como consecuencia una disminución en la frecuencia de la enfermedad.

- h) La aplicación de medidas preventivas específicas contra la supuesta causa deberá traer una disminución de la frecuencia de la enfermedad.
- i) Las relaciones o asociaciones deberán tener un marco biológico y epidemiológico verosímil.

Un aspecto importante en el concepto de causalidad es que para demostrar una relación causa- efecto entre dos variables, es necesario que exista una relación estadísticamente significativa. Este hecho sin embargo, no implica necesariamente una relación de causalidad (Jaramillo y Martínez, 2010).

Para considerar a una relación como causal es necesario que se tengan en cuenta los siguientes aspectos:

- *Relación temporal.* Implica poder demostrar que la posible causa debe anteceder en tiempo al efecto.
- *Fuerza de la asociación.* Es de esperar que si la supuesta causa o *factor de riesgo* efectivamente conlleva a un mayor riesgo de enfermedad, entonces es posible encontrar una mayor proporción de enfermos entre aquellos que estuvieron expuestos con respecto a los que no, esta diferencia puede medirse a través de indicadores como el riesgo relativo o razón de momios (razón de productos cruzados u OR).
- *Gradiente biológico.* Es posible esperar que entre mayor sea el grado de exposición al factor de riesgo, mayor será la respuesta, o dicho de otro modo, mayor será la incidencia o el grado de manifestación de la enfermedad; en este sentido es posible establecer el gradiente biológico por medio de pruebas como  $\chi^2$  de tendencia, análisis de varianza o regresión lineal, entre otras.
- *Coherencia o plausibilidad biológica.* La relación que se pretende comprobar debe tener una explicación lógica, dicha coherencia debe estar sustentada en conocimientos científicos, debe ser tan rigurosa al grado de limitar el planteamiento de posibles hipótesis, sin embargo, debe tener un buen sustento científico para avalarla.

- *Consistencia de la asociación.* Si efectivamente hay una relación causa-efecto, ésta se dará aún en condiciones diferentes de lugar y tiempo (Jaramillo y Martínez, 2010; Rothman y Greenland, 2005).

En epidemiología también se buscan los factores determinantes y factores de riesgo para la presentación de la enfermedad. Un factor de riesgo es cualquier exposición que muestra relación estadística con alguna respuesta que forma parte de la cadena causal. Un factor determinante es cualquier factor o variable que puede afectar la frecuencia de aparición de una enfermedad en la población (Burt, 2001; Putt *et al.*, 1987).

### **1.8.2. Epidemiología molecular**

Se ha conceptualizado a la epidemiología molecular como el estudio de la distribución y las determinantes de salud y enfermedad a través del uso de métodos de biología molecular (Zadoks y Schukken, 2006). Suele utilizarse el término *epidemiología molecular* de manera incorrecta para referir estudios de taxonomía y filogenia de microorganismos patógenos, ya que en este tipo de estudios sólo se llega a conocer las propiedades y características de los organismos, que pueden servir de base para estudios más profundos con enfoque epidemiológico (Riley, 2004).

El objetivo principal de la epidemiología molecular no es precisamente la clasificación de organismos en grupos taxonómicos o filogenéticos, sino la identificación y caracterización fina de los microorganismos responsables de las enfermedades infecciosas y determinar sus fuentes físicas, sus relaciones biológicas, y la ruta de transmisión. Además, la epidemiología molecular permite caracterizar los genes responsables de la virulencia, antígenos relevantes para el desarrollo de vacunas y los determinantes que confieren resistencia a antibióticos (Zadoks y Schukken, 2006).

Las estrategias de basadas en técnicas de biología molecular utilizadas en la caracterización de *S. aureus* se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Técnicas moleculares utilizadas en la caracterización de *S. aureus*

NOMBRE	FUNDAMENTO	PODER DISCRIMINATORIO	COSTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>PCR</b>					
<i>SCCmec-typing</i>					
Caracterización del <i>locus SCCmec</i> de resistencia a meticilina.	Polimorfismos en la longitud de los amplicones de la isla genómica <i>SCCmec</i> .	Moderado	Bajo	Realizable con insumos de biología molecular básicos	Reproducibilidad y repetibilidad medias. No utilizable en las cepas SASM
<b>MLVA</b>					
Análisis de repetidos en tándem de número variable.	Polimorfismo en la longitud de amplicones de genes de virulencia que contienen repetidos en tándem.	Moderado a alto	Bajo	Realizable con insumos de biología molecular básicos	Reproducibilidad y repetibilidad medias
<i>agr-typing</i>					
Caracterización del <i>locus</i> del regulador global accesorio, <i>agr</i> .	Polimorfismos de los amplicones de la región variable del <i>locus agr</i> .	Moderado	Alto	Portable. Reproducibilidad y repetibilidad altas	Solo cuatro grupos de clasificación
<b>SECUENCIACIÓN</b>					
<b>MLST</b>					
Análisis de las secuencias de <i>loci</i> múltiples	Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de genes de mantenimiento interdispersos en el genoma.	Moderado a alto (88.72)	Alto	Portable. Bases de datos globales que permiten integrar información a nivel mundial. Reproducibilidad y repetibilidad altas	Costo derivado de las reacciones de secuenciación. Específico de especie.
<i>spa-typing</i>					
Caracterización del <i>locus spa</i> .	Análisis de la secuencia y el contenido de repetidos de la región X de la proteína SpA.	Moderado a alto (91.31)	Medio	Portable. Bases de datos globales que permiten integrar información a nivel mundial. Reproducibilidad y repetibilidad altas	El gen de aislados bovinos parece ser muy polimórfico y no cubre los requisitos para registro en RIDOM. Específico de especie.

---

---

*PATRONES DE*

***RESTRICCIÓN***

*PFGE*

Análisis de macrorestricción	Perfiles de digestión con enzimas de restricción del genoma, analizado mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	Alto (91.31)	Medio a alto	Universal. Una vez montado, se puede aplicar a otras especies. Tiene el mayor poder de discriminación. Reproducibilidad y repetibilidad medias a altas.	Laborioso para montar. Discriminación depende de una buena elección de la enzima de restricción. Requiere equipo especializado
------------------------------	---	--------------	--------------	---	--

---

---

Modificada de Malachowa *et al.*, 2005; Foxman *et al.*, 2005; Gilot *et al.*, 2002.

### **1.8.3. Caracterización mediante secuencias multilocus (MLST)**

La caracterización mediante secuencias multilocus (MLST) como método de uso universal, portátil y definitivo para la tipificación de bacterias fue propuesto por Maiden (1998). MLST consiste en identificar la variación alélica de siete genes de metabolismo primario (Maiden, 2006). Fragmentos de aproximadamente 450 pb de cada uno de los 7 genes son secuenciados y comparados con alelos conocidos en el sitio oficial de MLST (<http://www.mlst.net>) para obtener el perfil alélico de cada cepa. A cada una de las cepas se le asigna una Secuencia- Tipo (ST) la cual las distingue.

Para establecer las relaciones evolutivas entre genotipos en la población (en este caso STs), se hace uso del algoritmo eBURST. La definición de grupos consiste en agrupar aquellos genotipos (STs) que comparten por lo menos 6 alelos idénticos, a este grupo se le denomina Complejo Clonal (CC). La predicción del genotipo fundador (clona fundadora) de cada grupo se basa en la identificación del genotipo que presenta mayor número de Variantes de un *locus* (SLV). En el caso de que dos genotipos presenten el mismo número de SLV, se considera como genotipo fundador aquel con mayor número de Variantes de Doble *loci* (DLV) (Feil y Enright, 2004).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La diseminación de *Staphylococcus aureus* es un grave problema de salud pública, ya que es el principal agente causal de mastitis bovina e infecciones nosocomiales en humanos. Su control y tratamiento han fracasado, debido a la diversidad de cepas existentes y a la ubicuidad del microorganismo. *S. aureus* en animales puede causar principalmente mastitis (en vacas y conejas), infecciones de la piel, condronecrosis y artritis séptica en aves, e infecciones nosocomiales en animales de compañía, entre otras; mientras que en el hombre puede ocasionar patologías diversas, tales como, dermatitis, infecciones respiratorias, del tracto urinario (adquiridas en la comunidad), otras son adquiridas en hospitales (nosocomiales) como endocarditis infecciosa, osteomielitis, del sistema nervioso central y bacteremias, todas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados (Amorim *et al.*, 2007; Dixon, 1995; Enright *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 1992; Zadoks *et al.*, 2000).

En el caso de los animales domésticos, particularmente en las vacas lecheras, afecta la productividad como consecuencia de la disminución de la producción láctea y cambios en la calidad organoléptica de la leche. En México las pérdidas económicas por mastitis bovina asociada han sido cuantificadas hasta por un monto de \$1,700.00 a \$2,000.00 pesos anuales por vaca (Wolter *et al.*, 2004). Este hecho también tiene un impacto negativo en la disponibilidad de este alimento para el consumo nacional, lo cual impide que el país logre su autosuficiencia alimentaria.

Desde el enfoque de la epidemiología molecular no se ha encontrado información referente a la existencia de estudios que caractericen cepas asociadas a la mastitis bovina y cepas involucradas en diversas patologías en humanos en el estado de Michoacán. Sin embargo, López- Meza *et al.*, (2006) reportaron la caracterización molecular de aislados de *Staphylococcus spp.*, asociados a mastitis bovina para la misma zona en estudio, mediante la amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD), mismos que en una publicación posterior se demostró que no eran *S. aureus* (Anaya- López *et al.*, 2006). Por su parte, en el estado de Jalisco Castañeda *et al.*, (2011) realizaron un estudio de caracterización de

aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina, estudio que no se asocia a un estudio epidemiológico formal.

La realización de un estudio epidemiológico molecular que identifique las cepas prevalentes en las zonas lecheras con sistemas de lechería familia, contribuiría en el diseño de estrategias de prevención y control que disminuyan el riesgo de diseminación de *S. aureus* en los animales y los humanos dentro del ecosistema productivo.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas con mastitis y los de humanos involucrados en las actividades pecuarias en sistemas de producción de lechería familiar en el municipio de Tarímbaro, Michoacán comparten el fondo genético.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **a. General**

- Caracterizar molecularmente aislados de *Staphylococcus aureus* asociado a la producción lechera en el municipio de Tarímbaro, Michoacán.

##### **b. Particulares**

- Diferenciar aislados de *Staphylococcus aureus* procedentes de vacas con mastitis del municipio de Tarímbaro y aislados procedentes de humanos portadores, involucrados con la producción lechera.
- Identificar los factores de riesgo para la prevalencia de mastitis en las granjas.
- Identificar los factores de riesgo para prevalencia de *S. aureus* en casos de mastitis bovina.

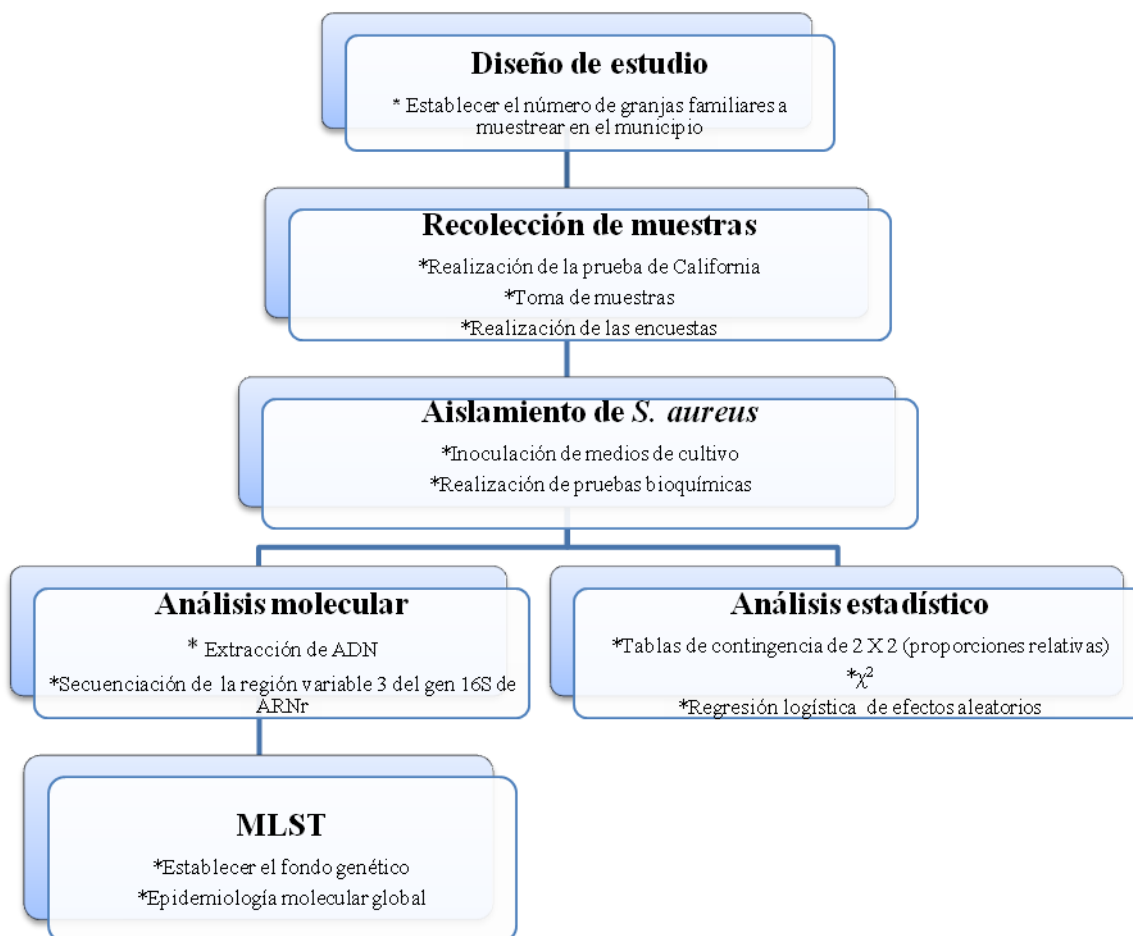


## VI. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

La población objetivo fue de 13 granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán, el cual cuenta con una superficie de 228.92 Km<sup>2</sup>, se ubica entre los paralelos 19°44' y 19°54' de latitud norte; los meridianos 101°03' y 101°17' de longitud oeste; altitud entre 1,900 y 2,400 m, el clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (44.20%), la temperatura oscila entre 16 y 18 °C (INEGI, 2009).

### *Diseño de muestreo*

El estudio realizado fue observacional transversal, el número de unidades de muestreo se calculó con un modelo aleatorio con distribución proporcional en función de la caracterización del sistema de lechería familiar mediante componentes principales y conglomerados (Sánchez *et al.*, 2004a, 2004b), partiendo de una prevalencia esperada de 84% de hatos con al menos una vaca con mastitis subclínica y de 65% con mastitis clínica, precisión del 10% y nivel de confianza de 95% (Agger *et al.*, 1991). El muestreo al interior de los establos se realizó por conglomerado (n=157 vacas en producción).



El proceso de recolección de muestras, aislamiento de *S. aureus*, análisis molecular y análisis estadístico se describen en el Capítulo 1 y Capítulo 2 de los resultados. El contenido de dichos capítulos se presenta en forma de artículos de investigación e incluyen datos adicionales generados por otros integrantes del laboratorio. Por ello, se presentarán datos que no derivan de los objetivos directamente planteados en este documento.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a. Capítulo 1

#### **MASTITIS BOVINA ASOCIADA A LA PRESENCIA DE *Staphylococcus aureus* EN GRANJAS FAMILIARES DEL MUNICIPIO DE TARÍMBARO, MICHOACÁN, MÉXICO: FACTORES DE RIESGO Y POLIMORFISMO DEL GEN DE LA COAGULASA.**

Angel-Andrés D, Solorio-Rivera JL, Navarrete-Cano JD, Bautista-Trujillo GU, García-Rodríguez FR, Rentería- Solórzano I, Carranza-Germán SI, Baizabal-Aguirre VM, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M y Valdez-Alarcón JJ

#### **RESUMEN**

La mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus* es una enfermedad que afecta a la industria lechera generando pérdidas entre \$1, 049.81 y \$1, 669.37 pesos por vaca. Los objetivos de éste trabajo fueron: determinar la prevalencia de mastitis en granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán; establecer los factores de riesgo asociados a la presentación de esta patología cuando es causada por *Staphylococcus aureus*; identificar genotipos asociados con el grado de mastitis El estudio se realizó en 13 granjas familiares del municipio de Tarímbaro. La prevalencia de mastitis fue del 44.58% (subclínica 42.03%, clínica de 2.54%). Se analizaron 137 muestras de leche, 11 de exudado faríngeo de humano, 6 de exudado nasofaríngeo humano y 10 muestras de fomites. 24 aislados fueron identificados como *S. aureus*. Los factores de riesgo que tuvieron una asociación positiva con la mastitis bovina fueron el ordeño manual y la presencia de 2 ordeñadores en granja ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la resistencia a antibióticos en 18 aislados. El 5.6% de los aislados fue resistente a 4, 5 y 7 antibióticos; el 16.7% a un antibiótico y el 22.2 % a 2 y 3 antibióticos. El porcentaje de aislados susceptibles a todos los antibióticos fue del 22.22%. Los aislados de *S. aureus* se caracterizaron mediante PCR-RFLP de la región 3' del gen que codifica para la coagulasa. Se identificaron 4 alotipos de los cuales el alotipo A fue el de mayor

prevalencia. El polimorfismo de fragmentos de la región 3' del gen de la coagulasa (*coa*) de *S. aureus* mostró una asociación entre el alotipo del gen y la forma de mastitis presentada, siendo el alotipo B el significativamente presente en casos mastitis clínica. Los diferentes alotipos de *coa* se registraron como un factor determinante para la prevalencia de mastitis en las granjas familiares de la región.

**Palabras clave:** mastitis bovina, *Staphylococcus aureus*, factores de riesgo, resistencia a antibióticos, coagulasa

## **ABSTRACT**

The milking industry has reported losses of \$1, 049.81 to \$1, 669.37 mexican pesos per cow because of mastitis associated with *Staphylococcus aureus*. The aims of this work were: to determine the mastitis prevalence in backyard farms in the municipality of Tarímbaro, Michoacán; to find the risk factors associated with this pathology when *Staphylococcus aureus* is present; to identify genotypes associated with the grade of mastitis. 13 backyard farms of the Tarímbaro municipality were included. The mastitis prevalence was 44.58% (subclinical 42.03%, clinical 2.54%). 137 milk, 11 human pharyngeal swabs, 6 human nasopharyngeal swabs y 10 fomites samples were analyzed. The risk factors associated with bovine mastitis were the manual milking and the presence of two milkingman ( $P<0.05$ ). The antibiotic resistance was also evaluated in 18 of the isolates. The 5.6% of the isolates were resistant to 4, 5 and 7 antibiotics; 16.7% to one and the 22.2% to 2 and 3. 22.2% of the isolates were susceptible to all the proved antibiotics. The *S. aureus* isolates were characterized by PCR- RFLP of the 3' region of the coagulase gen (*coa*). 4 alotypes were identified being alotype A the most prevalent. An association between the alotypes and the form of mastitis was found. The alotype B was related to clinical mastitis and alotypes A and D to subclinical mastitis. All *coa* alotypes were also found as a determinant factor to the prevalence of mastitis in the backyards of the region.

## INTRODUCCIÓN

En México, la leche se produce bajo tres sistemas principalmente: especializado, semiespecializado y familiar o de traspatio (Villamar y Olivera, 2005). En el Estado de Michoacán de Ocampo, el sistema familiar aporta en 90% de la producción. Aunque el sistema de producción familiar ha demostrado ser sustentable (Espinoza *et al.*, 2004), sigue existiendo un rezago tecnológico en las granjas familiares, reflejado principalmente en las condiciones sanitarias. La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que se da como resultado a la infección intramamaria por bacterias que producen la enfermedad de manera clínica o subclínica (Dos Santos *et al.*, 2002); también responde a factores ambientales. Los patógenos contagiosos de primera importancia aislados de mastitis bovina incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* (Riffon *et al.*, 2001; Bradley, 2002). Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario es el animal infectado o el cuarto de la ubre, pero también se ha aislado de las instalaciones y el equipo, alimento, otros animales y humanos (Boost *et al.*, 2007; Bradley, 2002; Cuny *et al.*, 2006, Roberson *et al.*, 1994; Rossitto *et al.*, 2002; Zadoks *et al.*, 2001). Se considera a *Staphylococcus aureus* como el principal agente causal de mastitis contagiosa (Abdel-Rady y Sayed, 2009; Hamilton *et al.*, 2006; Haltia *et al.*, 2006; Mekibib *et al.*, 2010; Nagahata *et al.*, 2007; Plozza *et al.*, 2011).

*Staphylococcus aureus* también causa enfermedades en los humanos, algunas adquiridas en la comunidad como dermatitis, infecciones respiratorias, del tracto urinario; otras son adquiridas en hospitales (nosocomiales) como endocarditis infecciosa, osteomielitis, del sistema nervioso central y bacteremias; todas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados (Amorim *et al.*, 2007; Dixon, 1995; Enright *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 1992; Zadoks *et al.*, 2000). Las diversas patologías causadas por *S. aureus* están relacionadas a la diversidad de factores de virulencia presentes en cada cepa. Los factores de virulencia de *S. aureus*, se han clasificado en tres categorías (Bustos *et al.*, 2006): 1) los involucrados en la adherencia a la célula hospedera o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del hospedero o la destrucción tisular,

como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares; y, 3) los involucrados en la invasión de la célula hospedera y penetración de los tejidos, como la toxina  $\alpha$ , hemolisinas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ .

La coagulasa tiene un papel importante en la patogenia de la enfermedad ya que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis. El gen *coa* en el extremo 3' tiene una región polimórfica de una serie de repetidos en tándem de 81 pb, número que difiere entre cepas y puede ser utilizado para la diferenciación entre aislados de *S. aureus* (Goh *et al.*, 1992; Shopsisin *et al.*, 2000). Las secuencias de estos repetidos son muy conservadas pero presentan diferencia individual en la presencia o ausencia del sitio de restricción de *AluI* (Phonimdaeng *et al.*, 1990). La amplificación-restricción (PCR-RFLP) del gen de la coagulasa (*coa*) de *S. aureus* ha sido considerada como método preciso de tipificación para determinar la variación entre las cepas aisladas de diferentes fuentes (da Silva *et al.*, 2006; Karahan y Cetinkaya, 2007; Katsuda *et al.*, 2005; Rodrigues y da Silva, 2005; Raimundo *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2000; Vautor *et al.*, 2005). Las cepas de *S. aureus* presentan una amplia resistencia a antibióticos, complicando la cura de la mastitis bovina cuando es causada por este patógeno.

Los objetivos de éste trabajo fueron determinar la prevalencia de mastitis en granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán, establecer los posibles factores de riesgo asociados a la presentación de esta patología cuando es causada por *Staphylococcus aureus* y buscar asociaciones con los genotipos prevalentes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Diseño del estudio*

La prevalencia de mastitis se estimó mediante un estudio observacional transversal. El número de unidades de muestreo se calculó con un modelo aleatorio con distribución proporcional en función de la caracterización del sistema de lechería familiar mediante componentes principales y conglomerados (Sánchez *et al.*, 2004a, 2004b), partiendo de una

prevalencia esperada de 84% de hatos con al menos una vaca con mastitis subclínica y de 65% con mastitis clínica, precisión del 10% y nivel de confianza de 95% (Agger *et al.*, 1991). Para el municipio de Tarímbaro, uno de los principales productores de leche de la región, y principal abastecedor de la capital del estado, la población objetivo fue de 13 unidades de producción que reúnen la tipología de granjas familiares: vacas en confinamiento, alimentación a base de maíz y alfalfa, tamaño de hato de entre 7 y 30 animales, producción diaria de leche aproximada de 14 litros por vaca y, mano de obra familiar (Sánchez *et al.*, 2008).

#### *Prueba de campo*

La recolección de muestras se realizó en 2 periodos, en los meses de octubre y noviembre de 2008 y enero de 2011. En los establos se realizó la prueba California para identificar a aquellas vacas en producción afectadas con algún grado de mastitis. Las muestras de leche (n=137) fueron tomadas sólo de vacas positivas (n=70) de acuerdo a Blanco (2001). Muestras de exudado faríngeo (n=11) o nasal (n=6) del personal de ordeño fueron tomadas con hisopos metálicos estériles y transportados en medio Infusión Cerebro- Corazón (BHI) ó de transporte de Stuart. También se recolectaron muestras de fomites y utensilios de ordeño (n=10).

#### *Aislamiento de *S. aureus**

El aislamiento de *S. aureus* se realizó inoculando los medios, a partir de las muestras recolectadas de campo, selectivos y diferenciales con la técnica de estría, para los cuales Granados B.E. (2010) estableció su eficiencia en muestras de origen bovino: Agar Staphylococcus-110 (S110), Agar sangre (AS) y/o CHROMagar™ Staph. aureus (CSA) (Gaillot *et al.*, 2000); se incubó a 37° C durante 24 horas. Las colonias que presentaron morfología colonial típica de *Staphylococcus* fueron seleccionadas para realizar las pruebas bioquímicas de coagulasa, catalasa, gelatinasa, hemólisis y fermentación de manitol, además de la tinción de Gram. Los primoaislamientos identificados como posibles *S. aureus* (n=35) se almacenaron en glicerol al 15% a -80°C hasta su análisis molecular. La resistencia a antibióticos se verificó mediante el método de difusión en disco de acuerdo con estándares del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) formato M100.

### *Análisis molecular de los aislados*

El ADN de los 35 aislados presuntivos de *S. aureus* se extrajo por el método de Fitzgerald *et al.*, (1997). La identificación de los aislados se realizó mediante la secuenciación de la región variable 3' del gen de ARNr 16S. La amplificación se realizó con los oligonucleótidos universales SRV31 (5'-CGG YCC AGA CTC CTA CGG G-3') y SRV32 (5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3') comúnmente utilizados en análisis de filogenia molecular, las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por un minuto: 25 ciclos de amplificación, desnaturalización a 96°C durante 30 s, alineamiento a 50°C durante 30 s, extensión a 50°C durante 4 min: y una extensión final a 72°C durante 7 min (Lee *et al.*, 1996). Los productos obtenidos, de aproximadamente 250 pb, se precipitaron con solución PEG (Polietilenglicol 8000 20%; NaCl 2.5 M) y se enviaron para secuenciación al Laboratorio de Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-Campus Guanajuato. Para la identificación del alotipo del gen *coa*, la amplificación se realizó con los oligonucleótidos y las condiciones descritas por Rodrigues y da Silva (2005). Brevemente, la amplificación se realizó con los oligonucleótidos Coag2 (5'-ACCACAAGGTACTGAATCAACG-3') y Coag3 (5'-TGCTTTCGATTGTTTCGATGC-3'). Para cada reacción de PCR la mezcla contenía 350 ng de ADN, 1.25 pmol de cada uno de los iniciadores, 200 µM de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 1.125 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1U de Taq polimerasa (Fermentas). El volumen de esta mezcla se ajustó a 40 µL con agua estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany) utilizando el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min: 30 ciclos de amplificación, desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineamiento a 55°C durante 2 min, extensión a 72°C durante 4 min: y la extensión final a 72°C por 7 min. Posteriormente, los amplicones se digirieron con la enzima *AluI* (Fermentas). El tamaño de los fragmentos de restricción del producto de PCR del gen *coa* se calculó con el programa de software GelAnalyzer 2010 (versión 2010a) utilizando el marcador de 100pb (GeneCraft) como referencia. Para construir los cladogramas de similitud, se construyó una matriz binaria con los tamaños moleculares de cada producto de restricción y se exportó al programa FreeTree (Pavliček *et al.*, 1999). El resultado se exportó al programa TreeView (Page, 1996) para trazar el cladograma.



### *Análisis estadístico*

Para determinar los posibles factores de riesgo para la prevalencia de mastitis y transmisión de *S. aureus* en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, se aplicaron encuestas al personal que labora al interior de cada establecimiento. Las variables de exposición se categorizaron y analizaron en tablas de contingencia 2 x K y se calcularon las proporciones relativas para las categorías de cada factor. La significancia estadística se calculó con la prueba de  $\chi^2$  con el paquete estadístico EGRET versión 2.0.31 (Cytel Software Corporation). Las variables de exposición con un valor de  $P < 0.21$  fueron incluidas en un modelo de regresión logística de efectos aleatorios paso a paso en el paquete estadístico EGRET versión 2.0.31 (Cytel Software Corporation), con la cual se establecieron como factores de riesgo para la prevalencia de mastitis aquellos con un valor de  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### *Prueba de campo*

Se muestrearon 13 granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán, 9 de las comunidades de Cótzio- Téjaro en el primer periodo; y 4 de la comunidad de Santa Ana en el segundo periodo. No se observó diferencia estadística en la prevalencia de mastitis entre el periodo de muestreo, ni en la influencia de la ubicación geográfica de las granjas. Las características de las granjas muestreadas se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de las 13 granjas familiares muestreadas en el municipio de Tarímbaro.

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>PORCENTAJE (Frecuencia)</b>
<i>Características generales</i>	
Localidad	
• Cótzio- Téjaro	69.2% (9)
• Santa Ana	30.8% (4)
Tamaño del hato	
• 4 a 8 vacas	38.5% (5)
• 10 a 15 vacas	30.8 (4)
• 23 a 36 vacas	30.8 (4)

---



---

Número de vacas en producción	
<ul style="list-style-type: none"> <li>De 2 a 5</li> <li>De 6 a 8</li> <li>De 12 a 20</li> <li>De 22 a 25</li> </ul>	<p>15.4 (2)</p> <p>38.5 (5)</p> <p>23.1 (3)</p> <p>23.1 (3)</p>
Agua potable	100% (13)
Utilización de detergentes en el lavado de utensilios	100% (13)
Utilización de antibióticos en el tratamiento de mastitis	100% (13)
Frecuencia de la Realización de la Prueba de California	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nunca</li> <li>Una vez al mes</li> <li>Tres o cuatro veces al año</li> </ul>	<p>15.4% (2)</p> <p>23.1% (3)</p> <p>61.5% (8)</p>
<b><i>Alimentación</i></b>	
Alfalfa	92.3% (12)
Alimento comercial concentrado	69.2% (9)
Avena	23.1% (3)
Maíz	84.6% (11)
Rastrojo	76.9% (10)
Salvado	15.4% (2)
<b><i>Características productivas</i></b>	
Número de partos	
<ul style="list-style-type: none"> <li>De 1 a 3</li> <li>De 4 a 6</li> </ul>	<p>7.7% (1)</p> <p>92.3% (12)</p>
Producción diaria de leche por vaca (L)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>De 4 a 8</li> <li>De 9 a 11</li> <li>De 12 a 15</li> </ul>	<p>38.5% (5)</p> <p>30.8% (4)</p> <p>30.8% (4)</p>
<b><i>Prácticas de ordeño</i></b>	
Cuenta con área exclusiva para el ordeño	100% (13)
Limpieza preordeño de la ubre	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mano</li> <li>Trapo</li> <li>Toallas desechables</li> </ul>	<p>53.8% (7)</p> <p>38.5% (5)</p> <p>7.7% (1)</p>

---



---

Tipo de ordeño	
• Manual	76.9% (10)
• Mecánico	23.1 (3)
Número de ordeñadores	
• Uno	30.8% (4)
• Dos	53.8% (7)
• Tres	7.7% (1)
• Cinco	7.7% (1)
Número de ordeños	
• Uno	23.1% (3)
• Dos	76.9% (10)
Utilización de sellador	100% (13)

La Prueba de California para Mastitis se realizó a 157 vacas en producción de las cuales 70 resultaron positivas. La prevalencia de mastitis encontrada fue del 44.58%, de la cual el 42.03% lo representa la mastitis subclínica y el 2.54% la mastitis clínica.

Para la identificación de los factores determinantes asociados a la prevalencia de mastitis, se analizaron 157 registros (correspondientes a las vacas en producción) mediante la prueba de  $\chi^2$ . Las variables que mostraron una significancia estadística ( $P < 0.21$ ) se muestran en la Tabla 2. Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.0018$ ) entre los diferentes establos para la presencia de mastitis. Los establos 8, 5, 7 y 10 presentaron hasta 6 veces mayor riesgo de presentar la enfermedad en sus vacas en producción. También otras variables como el ordeño manual, realizar dos ordeños al día, la realización de prueba de California de 3 a 4 veces al año, la limpieza preordeño de la ubre con la mano y leche de despunte y la presencia de *S. aureus* en humanos y en el animal incrementaron significativamente ( $P < 0.001$ ) el riesgo de padecer mastitis.

**Tabla 2.** Factores determinantes asociados a la prevalencia de mastitis en las granjas muestreadas.

FACTOR ASOCIADO	P	OR	95% IC
<b>Características generales</b>			
Establo	0.0018	-	-
• Establo 1	0.0116	-	-
• Establo 4	0.0183	0.2689	0.0717 – 0.9188
• Establo 5	0.0279	4.1311	0.9682 – 20.1797
• Establo 8	0.0523	6.6154	0.7230 – 153.3942
• Establo 11	0.0617	0.1656	0.0075 – 1.3948
• Establo 7	0.0766	3.9844	0.6939 – 29.6182
• Establo 10	0.1412	1.9766	0.7276 – 5.4381
• Establo 3	0.2032	0.0000	-
Tamaño del hato	0.0294	-	-
Vacas en producción	0.0145	-	-
<b>Alimentación</b>			
Alimento concentrado comercial	0.0929	0.4885	0.1934 - 1.2223
<b>Características productivas</b>			
Producción diaria de leche (L)			
• De 4 a 8	0.0973	0.3788	0.0975 - 1.3514
• De 9 a 11	0.0380	2.2347	0.9733 – 5.1676
<b>Manejo del ordeño</b>			
Tipo de ordeño			
• Manual	0.0026	2.7417	1.3435 – 5.6272
• Mecánico	0.0026	0.3647	0.1777 – 0.7443
Número de ordeños			
• Uno	0.0791	0.4160	0.1356 – 1.2235
• Dos	0.0791	2.4038	0.8173 – 7.3727
Limpieza pre- ordeño de la ubre			
• Mano y leche de despunte	0.0121	2.2726	1.1358 – 4.5637
• Trapo	0.0714	0.5490	0.2709 – 1.1087
Número de ordeñadores			
• Uno	0.0873	2.2522	0.8045 – 6.4212
• Dos	0.1381	0.6160	0.3086 – 1.2276
• Tres	0.1412	1.9766	0.7276 – 5.4381
<b>Medidas preventivas</b>			
Frecuencia de la realización de la Prueba de California			
• Nunca	0.1687	0.5313	0.1942 – 1.4210
• De 3 a 4 veces al año	0.0221	2.1176	1.1090 – 4.0436
<b>Riesgos biológicos</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i> en el animal	<0.001	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> de origen humano	0.1412	1.9766	0.7276 – 5.4381
Alotipo A del gen <i>coa</i> de <i>S. aureus</i>	0.0244	-	-
Alotipo B del gen <i>coa</i> de <i>S. aureus</i>	0.1137	-	-
Alotipo C del gen <i>coa</i> de <i>S. aureus</i>	0.1137	-	-
Alotipo D del gen <i>coa</i> de <i>S. aureus</i>	0.1137	-	-

P, probabilidad ( $P < 0.21$  estadísticamente significativa); OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza.

Los factores de riesgo para la prevalencia de mastitis (Tabla 3) se identificaron con un análisis de regresión logística de efectos aleatorios paso a paso, en la cual se incluyeron las variables de la Tabla 2. Los factores de riesgo identificados fueron el ordeño manual ( $P=0.0105$ ) y la presencia de 2 ordeñadores en granja ( $P=0.0351$ ). La realización de dos ordeños no fue estadísticamente significativa, sin embargo, existe un riesgo de casi tres

veces más de padecer mastitis en vacas expuestas a ésta práctica que en vacas que no lo están (OR= 2.9318, IC95% 0.0346 – 0.8852).

**Tabla 3.** Factores de riesgo para la prevalencia de mastitis. Se incluyeron las variables que presentaron una significancia estadística significativa en la prueba exploratoria de  $\chi^2$ .

VARIABLE	COEFICIENTE	DS	P	OR	IC 97% INFERIOR –SUPERIOR	
%GM	-0.1127	1.3375	0.9329	0.8935	0.0649	12.2911
Ordeño manual	1.1618	0.4542	0.0105	3.1957	1.3122	7.7831
Establo 10 (presencia de <i>S. aureus</i> en humanos)	-1.7570	0.9128	0.0543	0.1726	0.0288	1.0326
Producción de 4 a 8 litros diarios de leche	-1.4683	1.2173	0.2278	0.2303	0.0212	2.5036
Dos ordeños	1.0756	0.9315	0.2482	2.9318	0.4723	18.2000
Dos ordeñadores	-1.7423	0.8267	0.0351	0.1751	0.0346	0.8852
Nunca realizar la prueba de California	-1.8208	0.9669	0.0597	0.1619	0.0243	1.0772

DS, desviación estándar; P, probabilidad ( $P < 0.05$  estadísticamente significativa); OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza.

#### *Aislamiento e identificación de Staphylococcus aureus*

Se analizaron 137 muestras de leche, 11 de exudado faríngeo humano, 6 de exudado nasal humano y 10 muestras de fomites. Se inocularon los medios de cultivo AS, S110 y CSA, se incubó a 35°C por 24 horas. Las pruebas bioquímicas se realizaron a aquellas colonias que presentaron morfología típica de *S. aureus*. Se identificaron 35 aislados presuntivos de *S. aureus*, número representativo de la zona, de acuerdo a los criterios del diseño del estudio. Mediante la secuenciación de la región variable 3' del gen de ARNr 16S sólo 25 (71.42%) de ellos fueron identificados como *S. aureus*.

Para establecer factores determinantes asociados a *Staphylococcus aureus* aislado de vacas con mastitis los 70 registros de éstas fueron analizados con un análisis de  $\chi^2$  en el paquete estadístico EGRET versión 2.0.31 (Cytel Software Corporation), los resultados se muestran en la Tabla 4. El alotipo A del gen *coa* ( $P < 0.001$ ) tuvo una mayor relación que el resto de los alotipos. El alimento comercial representa cerca de 3 veces el riesgo para la presencia de *S. aureus* en las vacas positivas (OR= 2.9474, IC95% 0.5355 – 21.2216) que el resto de los alimentos suministrados (datos no mostrados). La presencia de *S. aureus* en alguno de los cuartos se asocia con la presencia de éste en el resto de los cuartos ( $P < 0.001$ ).

**Tabla 4.** Factores determinantes asociados a *Staphylococcus aureus* aislado de vacas con mastitis. Se analizaron los registros de las vacas positivas a la prueba de California de las granjas estudiadas.

VARIABLE	P
Establo	0.0001
• Establo 9	0.0605
• Establo 7	0.1346
• Establo 4	<0.001
Alimento comercial	0.1716
<i>S. aureus</i> en el animal	
• Un <i>S. aureus</i>	<0.001
• Dos <i>S. aureus</i>	<0.001
Alotipo A del gen <i>coa</i>	<0.001
Alotipo B del gen <i>coa</i>	0.0155
Alotipo C del gen <i>coa</i>	0.0155
Alotipo D del gen <i>coa</i>	0.0155

#### *Resistencia a antibióticos de los aislados de S. aureus*

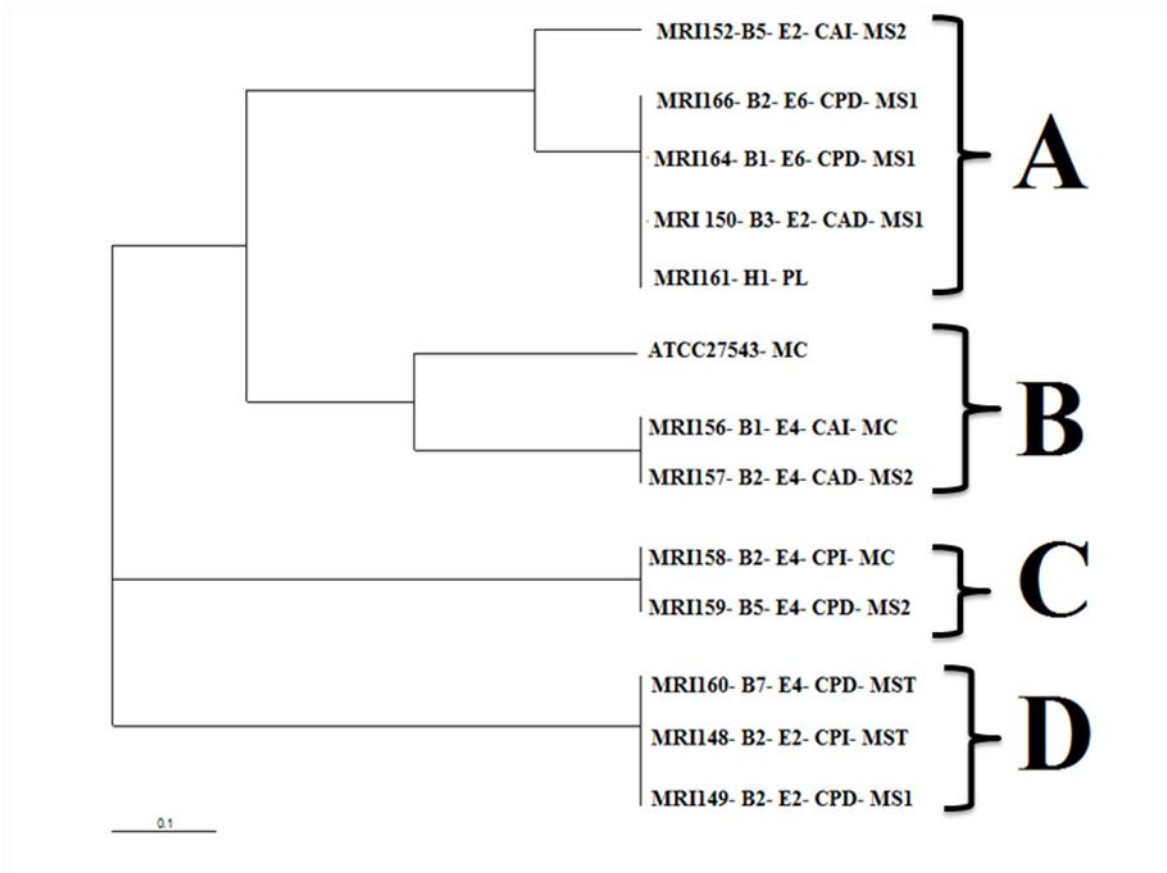
Con la finalidad de determinar la resistencia de los aislados de *S. aureus* a los antibióticos más comúnmente utilizados en el tratamiento de mastitis bovina, 18 de ellos fueron analizados. El porcentaje de resistencia se muestra en la Tabla 5. El 5.6 de los aislados fue resistente a 4, 5 y 7 antibióticos; el 16.7% a un antibiótico y el 22.2 % a 2 y 3 antibióticos respectivamente. El porcentaje de aislados susceptibles a todos los antibióticos fue del 22.22%.

**Tabla 5.** Resistencia a los antibióticos más comunes utilizados en el tratamiento de mastitis bovina. Se analizaron 18 aislados.

ANTIBIÓTICO	RESISTENCIA
Penicilina	55.6 %
Novobiocina 5µg	5.6 %
Novobiocina 30 µg	5.6 %
Ampicilina	50 %
Quinupristina/ Dalfopristina	16.7 %
Clindamicina	16.7%
Lincomicina	55.6 %
Oxacilina	11.1 %

#### *Análisis de la región 3' del gen coa*

De los 25 aislados identificados como *S. aureus*, 12 de ellos (humanos n=1, bovino n=11, muestras colectadas durante el 2008) se seleccionaron para amplificar la región 3' del gen *coa*. Los productos de amplificación fueron digeridos con la enzima *AluI*. En la Figura 1 se muestra el cladograma de similitud generado a partir del patrón de fragmentos de restricción con *AluI*.



**Figura 1.** Agrupamiento de los aislados de *S.aureus* de acuerdo al polimorfismo de los fragmentos de restricción de la región 3' del gen *coa* con la enzima de restricción *AluI*. MRI, aislado asociado a mastitis; B, bovino; H, humano; E, número de establo; CAD, cuarto anterior derecho; CAI, cuarto anterior izquierdo; CPD, cuarto posterior derecho; CPI, cuarto posterior izquierdo; MC, mastitis clínica; MS, mastitis subclínica; T, grado traza, 1 y 2 grados de mastitis subclínica. La barra horizontal indica la proporción de fragmentos de restricción diferentes para el total de fragmentos.

La relación entre el alotipo del gen *coa* con el tipo de mastitis (subclínica o clínica) se estableció con un análisis de  $\chi^2$ , además de los aislados de *S. aureus* de origen bovino (n=16) se incluyeron los datos de los aislados de origen humano (n=2), de fomite (n=1) y la cepa de referencia ATCC27543. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Relación del alotipo del gen *coa* con el grado de mastitis.

ALOTIPO DEL GEN <i>coa</i>	MASTITIS	P	OR	IC 95%
Alotipo A	Subclínica Grado 1	0.0382	21	0.6098 – 3879.75
Alotipo B	Clínica	0.0654	16	0.4072 – 32.36
Alotipo C	Subclínica Grado 2	0.3918	4	0.0671 – 294.75
	Clínica	0.3918	4	0.0671 – 294.75
Alotipo D	Subclínica Traza	0.0102	-	-

Los alotipos A, B y D mostraron una relación clara con algún grado de mastitis ( $P < 0.1$ ), por su parte el alotipo C no mostró relación estadística con ninguno de los grados de mastitis sin embargo, incrementa 4 veces el riesgo para mastitis subclínica grado 2 y mastitis clínica cuando este alotipo está presente.

## DISCUSIÓN

En los sistemas familiares de producción lechera la mastitis bovina es una enfermedad difícil de controlar y es la que mayores pérdidas económicas causa, ya sea por la baja producción de leche, el gasto en servicios veterinarios y antibióticos, o bien por el desecho de vacas productoras.

En este trabajo se aisló a *Staphylococcus aureus* de casos de mastitis bovina, fomites y humanos involucrados en la producción lechera en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México. Se analizaron los factores de riesgo para la prevalencia de mastitis y se analizó el polimorfismo del gen *coa* de los aislados.

La prevalencia de mastitis encontrada en el municipio de Tarímbaro (mastitis clínica 2.54% y mastitis subclínica 42.03%) señala una baja prevalencia en comparación a lo reportado por Hernández (2007), quien estimó prevalencias de 69.3% para mastitis subclínica y 12.4% mastitis clínica. Probablemente esta diferencia se relacione a la época del año del muestreo. Las muestras reportadas en este trabajo fueron colectadas en octubre de 2008 y enero de 2011 mientras que las muestras de Hernández fueron colectadas en los meses de noviembre



de 2006 a julio del 2007. Se ha reportado cambio en el recuento de células somáticas durante el verano, y a las diferencias en el microambiente al interior de las granjas.

La multicausalidad de la mastitis bovina evidencia la necesidad de conocer los factores de riesgo asociados a la prevalencia de esta patología en granjas familiares. Los factores determinantes para la prevalencia de mastitis en las granjas estudiadas (Tabla 2) se agruparon en características generales, de alimentación, productivas, manejo del ordeño medidas preventivas y riesgos biológicos.

Las variables relacionadas a las prácticas de ordeño han sido determinadas previamente (Abdel-Rady y Sayed, 2009; Breen *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2007; Haltia *et al.*, 2006; Mekibib *et al.*, 2010; Novoa *et al.*, 2005; Plozza *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2011). Sin embargo, las medidas preventivas (frecuencia de realización de la prueba de California OR= 2.11) y los riesgos biológicos como presencia de *S. aureus* en el animal ( $P<0.001$ ) y de origen humano ( $P=0.1412$ ) también contribuyeron de manera significativa.

El tamaño del hato y el número de vacas en producción son determinantes para la prevalencia de mastitis. La diferencia en el manejo y confort de las vacas en producción al interior del establo puede ejercer un efecto negativo en la producción y condición corporal de éstas incrementando el riesgo de padecer mastitis (Tabla 2). Las vacas con una producción de 9 a 11 litros diarios de leche tienen 2.2 veces más la posibilidad de enfermar de mastitis. Posiblemente esto se deba a la baja en el sistema inmunológico causado por un balance energético negativo durante el pico de producción en la lactancia (Togashi y Lin, 2004), dato que no pudo ser corroborado por desconocimiento de la etapa de lactancia individual.

El ordeño manual es el factor de riesgo con mayor asociación con la prevalencia de mastitis (Tabla 3). Vacas sometidas a ordeño manual tienen 3.19 veces más la posibilidad de enfermar de mastitis que aquellas sometidas a ordeño mecánico. Este dato concuerda con lo establecido por Ávila *et al.*, (2002) quienes mencionan una tasa de prevalencia de mastitis subclínica del 57% en granjas con ordeño manual y una de 33% en granjas con ordeño

mecánico. Durante el ordeño manual de las vacas, otros factores interactúan favoreciendo la infección, como lo son la limpieza preordeño de la ubre con la mano y leche de despunte (OR de 2.27), el ordeño dos veces al día (OR de 2.40), y el número de ordeñadores (un ordeñador OR de 2.25 y tres ordeñadores OR de 1.97 respectivamente), además del daño interno al pezón, consecuencia de la manipulación por parte del ordeñador (Tabla 2). El ordeño mecánico por su parte, contribuye a la diseminación de los agentes contagiosos de la mastitis bovina.

Se ha identificado a *S. aureus* como el microorganismo causal de mastitis contagiosa más prevalente (Abdel-Rady y Sayed, 2009; Hamilton *et al.*, 2006; Haltia *et al.*, 2006; Mekibib *et al.*, 2010; Nagahata *et al.*, 2007; Plozza *et al.*, 2011). El éxito de *S. aureus* como patógeno se debe a los factores de virulencia que éste posee (Bustos *et al.*, 2006; Liu, 2009). La diseminación de *S. aureus* en la granja se puede evitar con la aplicación de sellador después del ordeño, ya que actúa como un factor protector al acidificar el canal del pezón evitando la entrada y supervivencia de los microorganismos (Hillerton *et al.*, 2007). Se ha mostrado una reducción hasta del 65% de las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* con la aplicación de sellador (Galton, 2004). En todas las granjas analizadas se mencionó la utilización del sellador tras el ordeño. Sin embargo, se identificaron 25 aislados de *S. aureus*. Además de la presencia de *S. aureus* en el canal del pezón o dentro de la glándula mamaria, la presencia de *S. aureus* en fomites también contribuye al riesgo de prevalencia de éste patógeno en granja, ya que durante el ordeño las vacas entran en contacto directo con éstos, facilitando así su diseminación (Tabla 2) (Castro *et al.*, 2006; Philpot, 1999).

Los factores determinantes asociados a la prevalencia de *S. aureus* en vacas positivas a la prueba de California (Tabla 3) indican una diferencia entre establos ( $P= 0,0001$ ). En el establo 4 ( $P<0,001$ ) el ordeño fue mecánico y la limpieza preordeño de la ubre con toallas desechables, sin embargo, fue el establo con mayor prevalencia de *S.aureus*. Lo que sugiere que la presencia de *S. aureus* puede asociarse no sólo al manejo de la ordeña y prácticas de alimentación (Tabla 4) sino a la presencia misma de *S. aureus* en el animal y el personal de

ordeño. La presencia de *S. aureus* es también un factor determinante para la prevalencia de mastitis bovina en las granjas estudiadas (Tabla 2)

El polimorfismo del gen de la coagulasa de *S. aureus* mostró tener relación con la prevalencia de mastitis bovina en las vacas en producción y la prevalencia de *S. aureus* en éstas (Tabla 2 y Tabla 4). Se identificaron 4 alotipos regionales (A, B, C y D), de los cuales A fue el de mayor prevalencia. Anteriormente se ha señalado que en casos de mastitis bovina existen alotipos prevalentes pero ninguno presenta la asociación estadística de éstos con la forma de presentación de la patología (Güler *et al.*, 2005; Katsuda *et al.*, 2004; Momtaz *et al.*, 2011; Raimundo *et al.*, 1999; Rodrigues y da Silva, 2005). Además de la prevalencia del alotipo A en la región, se observó una asociación del alotipo del gen *coa* con la severidad de la mastitis presentada (Figura 1 y Tabla 6).

En los casos de mastitis subclínica los alotipos A y D son los más comúnmente asociados, incrementando el riesgo hasta en 21 veces. El alotipo A también estuvo presente en un aislado de origen humano, lo que sugiere una mejor adaptabilidad de las cepas de *S. aureus* con este alotipo para colonizar distintos hospederos, o bien a una transmisión cruzada entre hospederos. En el caso de la mastitis clínica el alotipo B parece ser el implicado ( $P=0.0654$ ) ya que se incrementa hasta 16 veces el riesgo de presentar mastitis cuando éste alotipo está presente. Esto podría ser un indicativo del potencial infeccioso que tienen los aislados que presentan los alotipos descritos del gen de la coagulasa, y su posible relación con otros factores de virulencia del microorganismo y el microambiente que se genera en el tejido de la glándula mamaria.

Además de seguir las recomendaciones para el control de la mastitis bovina, sugeridas por el Consejo Nacional de Mastitis, es indispensable seleccionar los antibióticos adecuados. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los de elección para tratar la mastitis bovina (Güler *et al.*, 2005). La susceptibilidad de los aislados de *S. aureus* del municipio de Tarímbaro a los antibióticos probados fue inferior a lo reportado por Güler *et al.*, (2005), en casos de mastitis en Anatolia Central. En un estudio realizado por Ochoa-Zarzosa *et al.*, (2008) en la misma región de estudio, obtuvieron 100% de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. En este estudio

se obtuvo sólo el 50% de resistencia a este tipo de antibióticos y a lincomicina, esto evidencia la presencia de cepas multiresistentes en la región. Loeza- Lara *et al.*, (2004) reportaron el caso de un plásmido que confiere resistencia a lincosamida en un aislado de origen bovino, sin embargo la utilización de este tipo de antibiótico no es de uso común en el tratamiento de mastitis bovina. Posiblemente la resistencia a lincosamidas cumpla una función biológica alternativa en el entorno. La búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de la mastitis bovina que relacionen la patología con factores inherentes al microorganismo aislado es necesaria para lograr mayor efectividad en el control de éstos.

## CONCLUSIONES

La prevalencia de mastitis en el municipio de Tarímbaro fue baja en comparación con datos reportados por otros autores en la misma región de estudio pese a las malas prácticas de ordeño realizadas. Los factores determinantes para la prevalencia de mastitis fueron en su mayoría relacionados con el manejo del ordeño. Los factores de riesgo por su parte fueron el ordeño manual, la presencia de 2 ordeñadores en granja y la presencia de *S. aureus* de origen humano.

La prevalencia de *S. aureus* estuvo determinada por las condiciones sanitarias y de manejo al interior de la granja, así como de la presencia de *S. aureus* en algún animal. La identificación del alotipo del gen *coa* señaló a los alotipos A, B, C y D en la región, siendo el alotipo A el más prevalente. Se encontraron correlaciones entre el alotipo del gen *coa* y el grado de afección de la mastitis: alotipos A y D se asociaron con mastitis subclínica y el alotipo B con mastitis clínica. En el caso del alotipo C no se obtuvo una relación precisa con algún grado de mastitis. Estos datos sugieren al alotipo B como el más virulento. Este hallazgo genera la necesidad de realizar pruebas de virulencia de aislados con los diferentes alotipos encontrados, para tratar de demostrar si existe una correlación funcional entre el genotipo y la virulencia.

## LITERATURA CITADA

Abdel-Rady, A., Sayed, M. 2009. Epidemiological studies on subclinical mastitis in dairy cows in Assiut Governorate. *Vet. World.* 2, 373 -380.

Agger, J. F., Noordhuizen J., Willeberg P., van Voorthuysen P, F. 1991. EPISCOPE v. 2.0.

Amorim, M. L., Faria, N. A., Oliveira, D. C. Vasconcelos, C., Cabeda, J. C., Mendes, A. C., Calado, E., Castro, A. P., Ramos, M. H., Amorim, J. M., de Lencastre, H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2881 –2888.

Ávila, T. S., Gutiérrez, C. A. J., Sánchez, G. J.I., Canizal, J. E. 2002. Comparación del estado de salud de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. *Vet. Méx.* 33, 387 -394.

Blanco, O.M.A. 2001. Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. Memorias del III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 21 al 23 de junio, León, Guanajuato, México.

Boost, M. V., O' Donoghue, M. M., Sui, K. H. G. 2007. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 731 –733.

Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164, 116 -128.

Breen, E.J., Green, J.M., Bradley, A.J. 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J. Dairy Sci.* 92, 2551 -2561.

Bustos-Martínez J.A., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cadenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed. 17, 287 -305.

Castro, O.F., Rojas, P.P., Rodríguez, Ll. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. Agrociencia. 22, 49 -58.

Cuny, C., Kuemmerle, J., Stanek, C., Willey, B., Strommenger, B., Witte, W. 2006. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterization and comparison with MRSA from humans. Euro Surveill. 11, 44 -47.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute.

Da Silva, E. R., Boechat, J.U.D., da Silva, N. 2006. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. Appl. Microbiol. 42, 30 -34.

Dixon, R. E. 1995. Cost of nosocomial infections and benefits of infection control programs. In Prevention and control of nosocomial infections. ed Wenzel R. P. (The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md), pp 19 -25

Dos Santos, J. N., dos Santos, N.K.R., Gentiline, E., Sordelli, D., de Freire, B.M. C. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. Vet Microbiol. 85, 133 -144.

Enright, M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008 -1015.

Espinoza G.J.A., Wiggins S., González O.A.T., Aguilar B.U. 2004. Sustentabilidad económica a nivel de empresa: aplicación a unidades familiares de producción de leche en México. Tec. Pecu. México. 42, 55 -70.

Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B. G., Moore, C. E., Day, N.P. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? J. Bacteriol. 185, 3307–3316.

Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V., 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Epidemiol. Infect. 119, 261–269.

Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., Berche, P. 2000. Evaluation of CHROMagar Staph.aureus® a new chromogenic medium for presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 38, 1587–1591.

Galton, D. M. 2004. Effects of an automatic postmilking teat dipping system on new intramammary infections and iodine in milk. J. Dairy Sci. 87, 225–231.

Goh, S. H., Byrne, S. K., Zhang, L.J., Chow, W. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 30, 1642–1645.

Granados, B. E. 2010. Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en las localidades de Cotzio y Téjaro, mediante secuenciación del gen de ARN ribosomal 16S. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Green, J. M., Bradley, A.J., Medley, G.F., Browne, W.J. 2007. Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. J. Dairy Sci. 90, 3764–3776.

Güler, L., Ok, Ü., Gündüz, K., Gülcü, Y., Hadimli, H.H. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gen typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J. Dairy Sci. 88, 3149–3154.

Haltia, L., Honkanen-Buzalski, T., Spiridonova, I., Olkonen, A., Myllys, V. 2006. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 48, 22.

Hamilton, C., Emanuelson, U., Forslund, K., Hansson, I., Ekman, T. 2006. Mastitis and related management factors in certified organic dairy herds in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 48, 11.

Hernández F. S., 2007. Factores de riesgo asociados a la prevalencia e incidencia de mastitis en el sistema de lechería familiar de Téjaro y Cotzío, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. p. 28

Hillerton, J. E., Cooper, J., Morelli, J. 2007. Preventing bovine mastitis by a postmilking teat disinfectant containing acidified sodium chlorite. *J. Dairy Sci.* 90, 1201 –1208.

Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J.G.M. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* 59, 16-23.

Horan, T. C., Gaynes, R. P., Martone, W. J., Jarvis, W. R., Emori, T. G. 1992. CDC definitions of nosocomial surgical site infections 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17, 780 –785.

Karahan, M., Cetinkaya, B. 2006. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Vet. J.* 174, 428 –431.

Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Eguchi, M. 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 105, 301 -305.



Liu, Y. G. 2009. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr. Res.* 65, 71-77.

Mekibib, B., Furgasa, M., Abunna, F., Megersa, B., Regassa, A. 2010. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and major pathogens in dairy farms of Holeta Town, Central Ethiopia. *Vet. World.* 3, 397 -403.

Momtaz, H., Tajbakhsh, E., Rahimi, E., Momeni, M. 2011. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis in Ifsahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces of Iran. *Comp. Clin. Pathol.* 20, 519 –522.

Nagahata, H., Ito, H., Maruta, H., Nishikawa, Y., Susukino, H., Matsuki, S., Higuchi, H., Okuhira, T., Anri, A. 2007. Controlling highly prevalent *Staphylococcus aureus* mastitis from dairy farm. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 893 -898.

Novoa, R., Armenteros, M., Abeledo, M. A., Casanovas, E., Valera, R., Caballero, C., Pulido, J. 2005. Factores de riesgo asociados a la prevalencia de mastitis clínica y subclínica. *Rev. Salud Anim.* 27, 84-88.

Page, R. D. M. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357 -358.

Pavliček, A., Hrdá, Š., Flegr, J. 1999. FreeTree – freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of the trees robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* 45, 97-99.

Philpot, W.N. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. En: Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la

Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores. p 49-84. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias; UFOCO S.A.

Phonimdaeng, P., O'Reilly, M., Nowlan, P., Bramley, J. A., Foster, J. T. 1990. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase- deficient mutants. Mol. Microbiol. 4, 393 –404.

Plozza, K., Lievaart, J.J., Potts, G., Barkema, H. W. 2011. Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. Aust. Vet. J. 89, 41-46.

Raimundo, O., Deighton, M., Capstick, J., Gerraty, N. 1999. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. Vet. Microbiol. 66, 275 -284.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2584 -2589.

Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E., 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J. Dairy Sci. 77, 3354 – 3364.

Rodrigues, da S. E., da Silva, N. 2005. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. Can. J. Vet. Res. 69, 260 –264.

Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J. L. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in central California dairies. J. Dairy Sci. 85, 132 -138.

Ruiz, A.K., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R.A., Sampaio, E., Lucena, E.R., Benone, S. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados; comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Rev. Salud Anim.* 33, 57- 64.

Sánchez, G.L.G., Solorio, R.J.L., Santos, F.J., Castelán, O.A. 2004a. Determinación de los componentes principales del sistema de lechería familiar en la región centro del Estado de Michoacán, México. In: Abstracts 8th Pan-American Dairy Congress. Pan-American Dairy Federation. Miami Beach, USA. 23-25 June 2004. p. 18.

Sánchez, G.L.G., Solorio, R.J.L., Santos, F.J., Castelán, O.A. 2004b. Tipificación de los sistemas de lechería familiar en la región centro del Estado de Michoacán, México. In: Abstracts 8th Pan-American Dairy Congress. Pan-American Dairy Federation. Miami Beach, USA. 23-25 June 2004. p. 18.

Sánchez, G.L.G., Solorio, R.J.L., Santos, F.J. 2008. Factores limitativos al desarrollo del sistema familiar de producción de leche, en Michoacán, México. *Cuadernos Des. Rural.* 5, 133 –146.

Shopsin, B., Gomez, M., Waddington, M., Riehman, M., Kreiswirth, N. B. 2000. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3453 –3456.

Su, C., Kanevsky, I., Jayarao, B.M., Sordillo, L. M. 1999. Phylogenetic relationships of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. *Vet. Microbiol.* 71, 53 -58.

Togashi, K., Lin, C. Y. 2004. Development of an optimal index to improve lactation yield and persistency with the least selection intensity. *J. Dairy Sci.* 87, 3047 -3052.

Vautor, E., Corinne, J., Chevalier, N., Visomblin, N., Vernet, G., Pépin, M. 2005. Characterization of 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, predominantly from dairy sheep,

using four different techniques of molecular epidemiology. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 363 – 368.

Villamar, A.L., Olivera, C.E. 2005. Situación actual y perspectiva de la Producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación general de ganadería. SAGARPA. México.

Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Gröhn, Y. T., Schukken, Y. H. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. J. Dairy Sci. 84, 590 - 599.

Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., van Belkum, A., 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 38, 1931 –1939.

## **b. Capítulo 2**

### **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Staphylococcus aureus* ASOCIADOS A CASOS DE MASTITIS BOVINA EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE TRASPATIO DEL MUNICIPIO DE TARÍMBARO, MICHOACÁN, MÉXICO**

#### **RESUMEN**

*Staphylococcus aureus* es un patógeno que causa enfermedades a humanos y animales. Las cepas que afectan a humanos se han clasificado en cepas adquiridas en la comunidad (AC) y cepas adquiridas en hospital (AH), mientras que las cepas de animales se asocian a mastitis, infecciones en piel y heridas quirúrgicas. Estudios de caracterización molecular de aislados de *S. aureus* de bovinos y humanos mediante Análisis de Secuencias Multilocus (MLST) han permitido clasificarlos en distintos complejos clonales, los cuales se asocian tanto al tipo de patología como a la especificidad de hospedero. En el país, se han reportado cepas resistentes a meticilina en portadores sanos y cepas asociadas a la clona pandémica USA 300. Sin embargo, en Michoacán y, específicamente en sistemas de producción de leche de traspatio, no existen estudios de epidemiología molecular que analicen la diversidad de cepas involucradas en la mastitis bovina y aquellas en las enfermedades causadas por éste patógeno en humanos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente aislados de *S. aureus* asociado a la producción lechera en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, utilizando la estrategia de MLST. Se identificaron 4 alelos nuevos y 12 Secuencia-Tipo (STs) nuevas. Los STs de los aislados de la región se pueden agrupar en el complejo clonal NST-4 (CCNST-4), asociados a bovinos. El NST-4 parece ser el de mayor prevalencia regional con capacidad de colonizar fomites, humanos y causar enfermedad en los bovinos. Análisis de mínima dispersión y de eBURST sugieren que existe un grupo de cepas derivadas del NST-4. El análisis de  $\chi^2$  asoció al ST1476 con casos de mastitis subclínica y a los STs 188, NST1 y NST12 con casos de mastitis clínica. La presencia del ST8 en bovinos y del NST-4 en humanos sugiere que cepas con este genotipo tienen un alto potencial zoonótico.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, mastitis bovina, MLST

## **ABSTRACT**

*Staphylococcus aureus* is a pathogen that causes diseases in both humans and animals. The strains in humans have been classified in Community. Acquired (CA) and Hospital Acquired (HA), while animal strains are associated with mastitis, skin infections and surgical lesions. According to Multi- *locus* sequence typing (MLST) isolates of *S. aureus* from bovine and human origin have been classified in different Clonal Complexes (CCs), associated to the pathology and host. In México, Methicillin- Resistant strains of *S. aureus* (MRSA) have been reported in healthy carriers and strains associated to the pandemic clone USA 300. Nevertheless, in Michoacán and, in backyard dairy farms, there are no epidemiological reports analyzing the diversity of the strains associated to bovine mastitis and those strains find in human infections. The aim of this work was to type by molecular means isolates of *S. aureus* associated to milk production in the municipality of Tarímbaro, Michoacán, by using the MLST approach. 4 new alleles (Nas) and 12 new Sequence-Type (NSTs) were identified. The regional STs were grouped in the Clonal Complex NST-4 (CCNST-4). The most prevalent ST was NST-4, associated to bovines, it also was found in cows, human and fomites. The analysis of minimum spanning and eBURST suggest that the regional genotypes were derived from the NST-4.  $\chi^2$  analysis associated ST1476 with subclinical mastitis cases and ST188, NST1 y NST12 with clinical mastitis cases. The presence of ST8 in bovines and, NST-4 in humans suggest that strains with these genotypes may have a high zoonotic potential.

## **INTRODUCCIÓN**

La mastitis bovina, en su forma clínica o subclínica, es una de las enfermedades que mayores pérdidas económicas causa a la industria lechera ya sea por la disminución en la producción de leche o bien por cambios en la calidad de ésta. *S. aureus* es uno de los principales agentes contagiosos causantes de mastitis, causando, además, infecciones de la piel, condronecrosis, artritis séptica, entre otras afecciones. (Plozza *et al.*, 2011; Lowder *et*

*al.*, 2009). La glándula mamaria es el principal reservorio de éste patógeno, sin embargo, ha sido aislado de varias zonas del cuerpo de vaquillas y del ambiente de la granja (Smith *et al.*, 2005a, 2005b).

En humanos, *S. aureus* es un residente persistente de la nariz en 20% de la población sana y en portadores intermitentes en un 60% (Apolonio *et al.*, 2011; Hamdan- Partida *et al.*, 2010; Kluytmans *et al.*, 1997). Los portadores nasales han sido identificados como un factor de riesgo en la patogénesis de infecciones por *S. aureus* adquiridas en la comunidad y nosocomiales (Bae *et al.*, 2010). En México, Apolonio *et al.*, (2011) identificaron en portadores sanos SARM en pacientes dentales, y Velázquez- Meza *et al.*, (2011) reportaron la presencia de la primer aislamiento SARM- AC con ST8 (asociado a la clona pandémica USA 300). Las patologías más comunes en humanos son dermatitis, infecciones respiratorias y del tracto urinario, endocarditis infecciosa, osteomielitis, bacteremias e intoxicaciones alimentarias todas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados (Amorim *et al.*, 2007; Dixon, 1995; Enright *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 1992; Zadoks *et al.*, 2000).

*S. aureus* se puede identificar por métodos fenotípicos que incluyen la morfología colonial, pruebas bioquímicas, patrón de susceptibilidad a antibióticos, susceptibilidad a fagos y producción de toxinas. Las cepas de *S.aureus* causantes de diversas patologías se caracterizan con métodos moleculares que incluyen, principalmente, la macrorestricción en campos pulsados (PFGE), caracterización mediante secuencias multilocus (MLST), SCC*mec*- y *spa*- typing (Leonard y Markey, 2008). La resistencia a antibióticos se sugiere que es el resultado de la adquisición horizontal de múltiples elementos genéticos móviles (Diep y Otto, 2008). Existen cinco linajes principales de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) con carácter pandémico: Clona Británica (ST36), Clona Pediátrica (ST5), Clona Nueva York (ST5), Clona Japón (ST5) y Clona Ibérica (ST274) (Enright *et al.*, 2002). Actualmente, han surgido nuevas cepas de interés epidemiológico, SARM-AC-ST30, SARM-AC-ST80, SARM-AC-ST59, SARM-AC-ST8 (clona USA 300), ésta última presente en patologías típicas de hospital (Diep y Otto, 2008). Estudios realizados en animales de compañía revelan que las cepas SARM encontradas en éstos animales son

idénticas a las encontradas en hospitales humanos mientras que aquellas encontradas en otras especies animales (ganado bovino, cerdos, equinos y aves) parecen ser distintas (Leonard y Markey, 2008). El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis y de humanos involucrados en actividades pecuarias en granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Aislados bacterianos*

En este estudio fueron analizados aislados de diferente origen. La recolección de muestras se realizó de acuerdo a Blanco (2001). El aislamiento de *S. aureus* se realizó utilizando los medios Agar Staphylococcus-110 (S110), Agar sangre (AS) y/o CHROMagar™ Staph. aureus (CSA) (Gaillot *et al.*, 2000). Un total de 40 aislados fueron utilizados para el análisis de MLST (Caracterización mediante secuencias multilocus): 31 aislados del municipio de Tarímbaro, Michoacán (2 de origen humano, 1 de fomite y 28 de leche de mastitis bovina), 5 aislados de una colección de casos de mastitis del estado de México, 3 aislados de casos de mastitis clínica de Yuriria, Guanajuato y la cepa de referencia ATCC27543. La confirmación de la identidad de los aislados se realizó por secuenciación de la región variable 3' del gen de ARN ribosomal 16S.

### *Análisis filogenético*

El análisis de las secuencias obtenidas fue comparado con las de bancos de secuencias (GenBank). Se realizó con el algoritmo BlastN en la página disponible en el sitio de Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias que presentaron mayor similitud, se compararon y alinearon con el programa Clustal W para la construcción del árbol filogenético, los alineamientos se importaron al Software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2007) v5.01 y la construcción se realizó utilizando el algoritmo de Neighbor-joining, utilizando la matriz de comparación de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980), con un análisis bootstrap de 1000 repeticiones.



## MLST

Para la caracterización mediante secuencias multilocus (MLST) el ADN se obtuvo por el método modificado de Enright *et al.*, (2000). La limpieza de los productos de PCR se realizó con la combinación de Exonucleasa I y fosfatasa alcalina (Exo-SAP; Fermentas). La amplificación y secuenciación de los fragmentos de los genes que codifican para las enzimas carbamato-cinasa (*arcC*), shiquimato-deshidrogenasa (*aroE*), glicerol-cinasa (*glpF*), guanilato-cinasa (*gmk*), fosfo-acetil transferasa (*pta*), triosa-fosfato isomerasa (*tpi*) y acetil coenzima A-acetil transferasa (*yqiL*) se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Enright *et al.*, (2000). Los alelos de cada gen se compararon con los reportados en la base de datos de MLST para *Staphylococcus aureus* (<http://www.mslt.net>) para la designación del número de alelo correspondiente para cada uno de los alelos. Con la combinación de alelos se designó el número de Tipo de Secuencia (ST). Para la elaboración del árbol de mínima dispersión se hizo uso del software disponible en <http://pubmlst.org/>. El agrupamiento de los STs se realizó mediante el algoritmo eBURST v3 de libre acceso en <http://saureus.mlst.net/>. La diversidad nucleotídica de los alelos se analizó con el software DnaSP versión 5.10.01.

## RESULTADOS

Se analizaron 39 aislados y la cepa de referencia ATCC27543, su origen, región y perfil alélico se muestran en la Tabla 1. Se identificaron 18 STs (12 no reportados) y 4 alelos nuevos. Los STs nuevos (NST), fueron en su mayoría, encontrados en los aislados de la región de Tarímbaro del 2008 en muestras de leche. Los STs se agruparon en 2 complejos clonales, uno derivado de un ST nuevo CCNST-4 y CC126, los STs 8, 188, NST-7 y NST-11 no agruparon en ninguno de éstos (Figura 3). En el caso de los alelos *aroE*, *glpF* y *gmk* se observó la presencia de alelos nuevos en aislados de Tarímbaro y Toluca (Tabla 1).

**Tabla 1.** Origen de los aislados, perfiles alélicos y ST encontrados.

AISLADO	ORIGEN	REGIÓN	AÑO	PERFIL ALÉLICO	SECUENCIA-TIPO (ST)
ATCC27543	Leche			3,3,1,1,4,4,3	8
MRI 3	Leche	Tarímbaro	2004	3,3,1,1,4,4,3	8
MRI 12	Leche	Tarímbaro	2004	3,78,1,88,1,5,1	NST-2
MRI 14	Leche	Tarímbaro	2004	3,3,1,1,4,4,3	8
MRI 21	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 22	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,88,1,5,3	1476
MRI 23	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 29	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 32	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 33	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,88,1,5,3	1476
MRI 34	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 36	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 37	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 147	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,5,40	126
MRI 148	Leche	Tarímbaro	2008	3,Na-1,1,4,1,5,40	NST-9
MRI 149	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,88,1,5,3	1476
MRI 150	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,88,1,5,3	1476
MRI 152	Leche	Tarímbaro	2008	52,79,54,154,56,32,65	NST-11
MRI 155	Humano	Tarímbaro	2008	3,1,1,8,1,1,1	188
MRI 156	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,1,40	NST-12
MRI 157	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,8,1,1,1	188
MRI 158	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,4,1,5,1	NST-1
MRI 159	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,4,1,5,40	NST-8
MRI 160	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,5,40	126
MRI 161	Humano	Tarímbaro	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST-4
MRI 162	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,Na-3,88,1,5,11	NST-7
MRI 163	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,Na-4,1,5,40	NST-10
MRI 164	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,88,1,5,3	1476
MRI 165	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,88,1,5,3	1476
MRI 166	Leche	Tarímbaro	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST-4
MRI 167	Fomite	Tarímbaro	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST-4
MRI 170	Leche	Tarímbaro	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 171	Leche	Yuriria	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 172	Leche	Yuriria	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST4
MRI 173	Leche	Yuriria	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST-4
MRI 174	Leche	Toluca	2008	3,78,1,88,1,32,3	NST-6
MRI 175	Leche	Toluca	2008	3,78,1,Na-4,1,32,3	NST-5
MRI 176	Leche	Toluca	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST-4
MRI 177	Leche	Toluca	2008	3,78,1,88,1,5,3	NST-4
MRI 180	Leche	Toluca	2008	3,Na-2,1,1,1,5,3	NST-3

MRI, Aislado asociado a mastitis bovina; Perfil alélico (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqiL*); Na, Nuevo alelo; NST, Nuevo ST y números en rojo por verificar.

Para poner de manifiesto la diversidad de cada alelo y su aporte a las diferencias en el MLST, se analizaron el número de sitios polimórficos, el índice de diversidad nucleotídica, el índice de heterozigocidad y el coeficiente de sustituciones no sinónimas sobre sinónimas. Los alelos *aroE*, *gmk*, *tpi* y *yqiL* fueron los que presentaron mayor diversidad nucleotídica (Tabla 2). La razón de sustituciones no sinónimas sobre sinónimas fue superior a la unidad en *aroE* y *pta*. Los alelos nuevos se presentaron para los genes *aroE*, *glpF* y *gmk*.

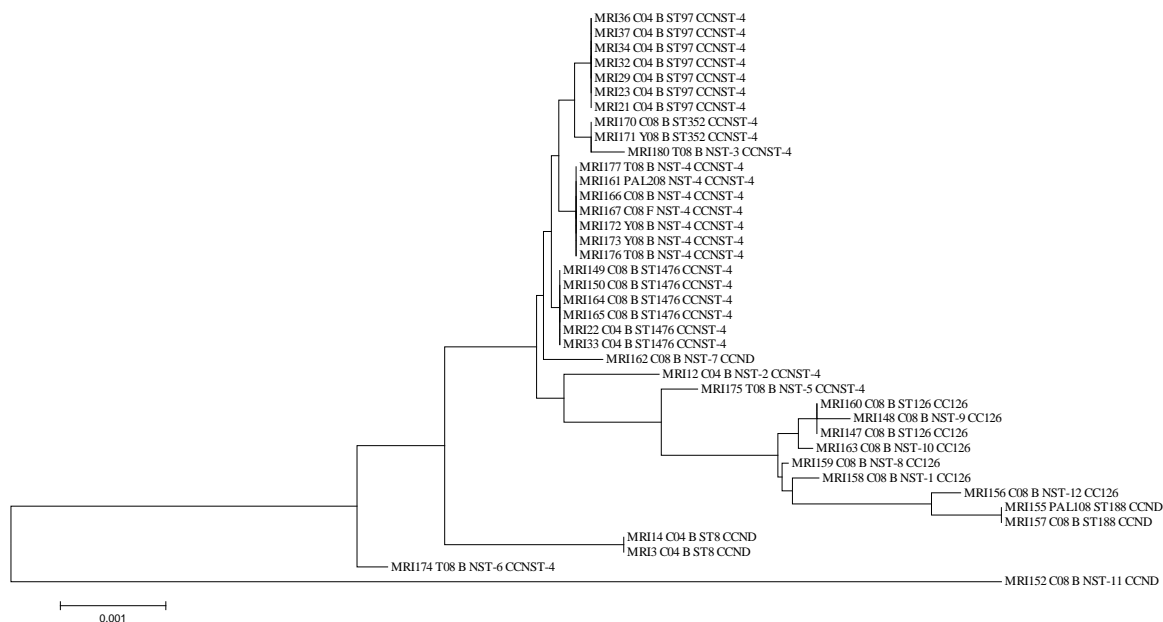
**Tabla 2.** Índice de diversidad nucleotídica de los alelos

GEN	TAMAÑO DEL FRAGMENTO	No. SITIOS POLIMORFICOS	$\pi$	NÚMERO DE ALELOS (Hd)	dN	dS	dN/dS
	AMPLIFICADO						
<i>arcC</i>	456	6	0.00067	2(0.051)	1	6	0.167
<i>aroE</i>	456	9	0.00276	7(0.695)	5	4	1.250
<i>glpF</i>	465	5	0.00055	3(0.101)	2	3	0.667
<i>mk</i>	429	10	0.00427	6(0.630)	2	8	0.250
<i>pta</i>	474	5	0.00094	3(0.148)	3	2	1.500
<i>tpi</i>	402	8	0.00375	4(0.324)	1	7	0.143
<i>yqiL</i>	516	18	0.00412	5(0.498)	5	13	0.385

*arcC*, cabamato cinasa; *aroE*, shiquimato deshidrogenasa; *glpF*, glicerol cinasa; *gmk*, guanilato cinasa; *pta*, fosfo-acetil transferasa; *tpi*, triosa- fosfato isomerasa; *yqiL*, acetil coenzima A-acetil transferasa;  $\pi$ , índice de diversidad nucleotídica; Hd, heterogocidad; dN, sustituciones no sinónimas, dS; sustituciones sinónimas; dN/dS, razón de sustituciones

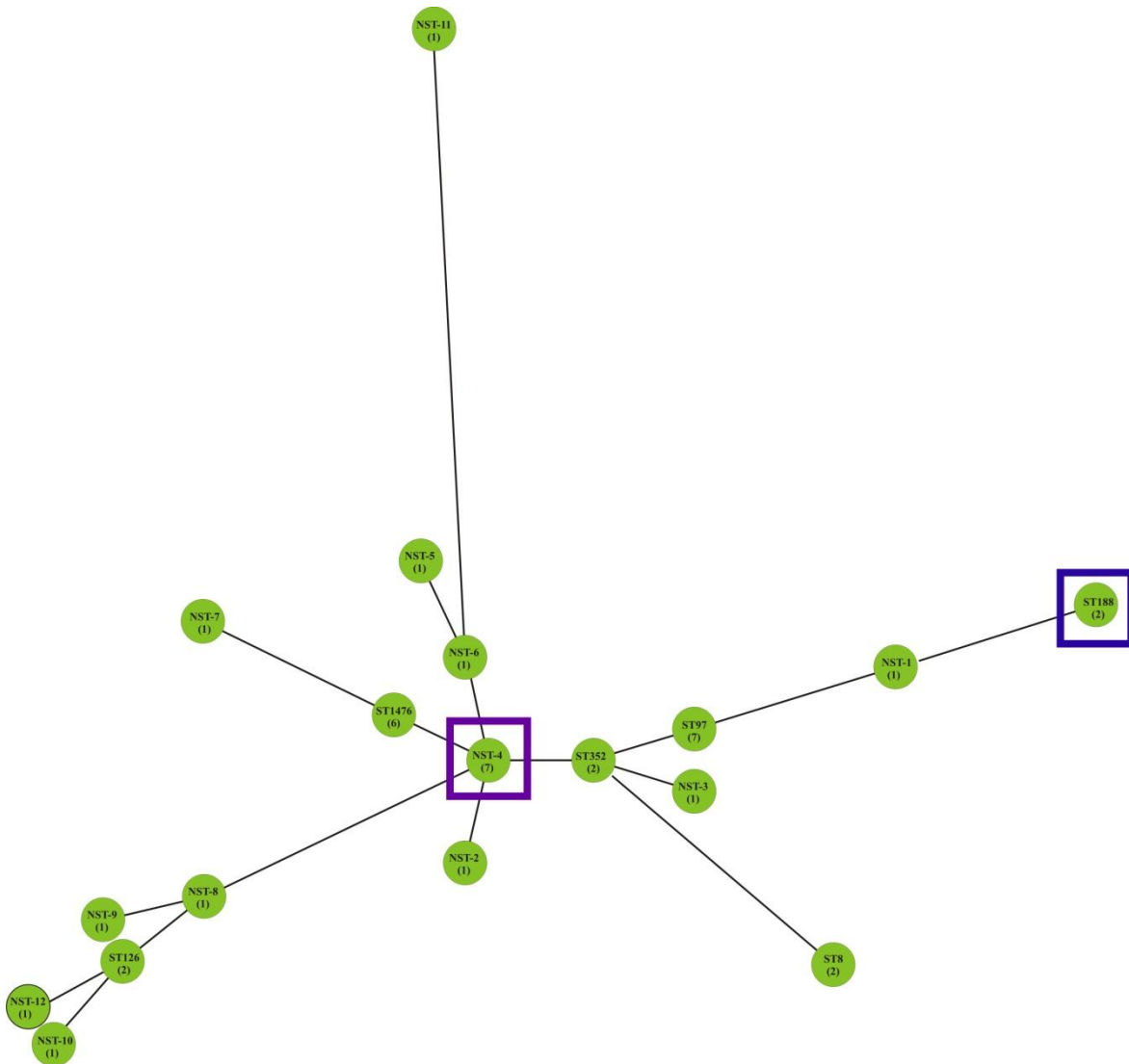
La relación filogenética entre los aislados se muestra en la Figura 1. Los grupos definidos muestran una distribución uniforme de acuerdo a los STs y éstos, en algunos casos, se agrupan de acuerdo a la región de estudio. El grupo del ST97 estuvo representado sólo por aislados de origen bovino de Tarímbaro del 2004. En el grupo formado por el NST-4 se encuentran aislados sólo del 2008, de las tres regiones estudiadas y de origen humano, bovino y fómite. Los aislados del ST1476 sólo fueron identificados para la región de Tarímbaro. Los STs nuevos agruparon en su mayoría en el CC126. STs pertenecientes al mismo complejo clonal (CC) también se ubican dentro del mismo grupo, excepto los

aislados MRI162, MRI155, MRI157, MRI152, MRI14 y MRI3 que no pertenecen al CCNST-4 ni al CC126. El aislado MRI174 no agrupó con el resto de los aislados del CCNST-4. En el caso del MRI152 la falta de agrupación se explica por la combinación de alelos tan distinta al resto de los aislados (Tabla 1).



**Figura 1.** Relación filogenética de los aislados. Secuencias de MLST analizadas por Neighbor-Joining (NJ). Bootstrap de 1000 repeticiones, verosimilitud compuesta, utilizando todos los marcos de lectura abiertos (MLA). En el orden de aparición MRI, aislado asociado a mastitis bovina; C04, región Cótzio- Téjaro 2004; C08, región Cótzio- Téjaro 2008; Y08, región Yuriria 2008; T08, región Toluca 2008; PAL, personal asociado al laboratorio 2008; ST, Secuencia-Tipo; NST, nuevo ST; B, muestra de leche de vaca con mastitis bovina; F, muestra de fomite y CC, complejo clonal. Los grupos definidos, en su mayoría, coinciden con los STs.

Para agrupar a los aislados en base al perfil alélico y predecir si existe una relación de origen entre las cepas y así determinar la posible presencia de clonas fundadoras, se elaboró un árbol de mínima dispersión (Figura 2). Se observa la formación de 5 grupos, los cuales convergen en el NST-4, el cual presenta la mayor frecuencia y el mayor número de relaciones de heterogeneidad con muestras de origen humano, leche y fomite, así como de las 3 regiones es estudio. El ST188 agrupa aislados de origen bovino y humano.



**Figura 2.** Agrupamiento de los aislados en base al ST. Se observa la distribución de los aislados en 5 grupos convergentes en el NST-4. NST, nuevo ST; ST, secuencia tipo. El número en paréntesis señala la frecuencia del ST. En morado se señala la posible clona fundadora. En azul, ST que agrupa sólo muestras de humano y de leche.

Para determinar la relación genética entre los aislados, conocer su agrupación y determinar el posible genotipo fundador de cada grupo posible, se elaboró un mapa con el algoritmo eBURST (Figura 3 y Tabla 3). Los aislados de las regiones en estudio se agrupan en 2 Complejos Clonales principales, CCNST-4 y CC126 (Tabla 3). Los aislados pertenecientes al mismo CC comparten hasta 6 alelos.

El CCNST-4 es el más numeroso (Tabla 3), con un total de 26 aislados, representativos de las 3 regiones en estudio, de origen bovino, humano y de fomite. Los aislados corresponden a los años 2004 y 2008. El ST fundador de este CC es el NST-4, ya que es el ST con mayor número de variantes de un solo *locus* que demuestra la divergencia de éste, además de ser el más prevalente. Los STs 352, 97 y 1476 han sido reportados en animales domésticos. Por su parte, el CC126 se integra, exclusivamente, por aislados de leche de bovino del año 2008 de la región de Tarímbaro (Tabla 3). El ST126 (reportado previamente en leche de bovino) se comporta como fundador de este CC. El resto de STs del CC, variantes de un solo *locus* del ST126, no han sido antes reportados. Los STs que no agruparon en ninguno de los CC de nuestra población fueron ST8, ST188, NST-11 y NST-7.

**Tabla 3.** Análisis eBURST de los aislados del municipio de Tarímbaro y aislados complementarios.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> en el municipio de Tarímbaro, Michoacán</b>								
No. de aislados: 39								
No. de STs= 18								
No. de réplicas por bootstrapping= 1000								
No. de <i>loci</i> por aislado= 7								
No. de <i>loci</i> idénticos para la definición de grupo= 6								
No. de grupos= 2								
<b>COMPLEJO CLONAL NST-4</b>								
No. de aislados: 26								
No. de STs= 8								
Posible fundadora: <b>NST-4</b>								
ST	FRECUENCIA	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap	
							Grupo	Subgrupo
NST-4	7	4	3	0	0	1.42	73%	54%
352	2	3	4	0	0	1.57	24%	19%
97	7	3	1	3	0	2.0	23%	19%
1476	6	2	4	1	0	1.85	2%	0%
NST-6	1	2	3	2	0	2.0	2%	0%
NST-3	1	2	2	3	0	2.14	0%	0%
NST-2	1	1	3	3	0	2.28	0%	0%
NST-5	1	1	2	4	0	2.42	0%	0%
<b>COMPLEJO CLONAL 126</b>								
No. de aislados: 7								
No. de STs: 6								
Posible fundadora: <b>ST126</b>								
ST	FRECUENCIA	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap	
							Grupo	Subgrupo
126	2	4	1	0	0	1.2	74%	51%
NST-8	1	3	2	0	0	1.4	36%	17%
NST-9	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%
NST-12	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%
NST-10	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%
NST-1	1	1	2	2	0	2.2	0%	0%
<b>NO AGRUPADOS</b>								
NST-11								
NST-7								
8								
188								

ST, secuencia tipo; SLV, variante de un solo *locus*; DLV, variante de doble *loci*; TLV, variante de tres *loci* y SAT, secuencia satélite

El comportamiento de los aislados en el contexto mundial se estableció utilizando el algoritmo eBURST y la base de datos global disponible en el sitio <http://www.saureus.mlst.net>. Fueron incluidos 4208 aislados de *S. aureus*, los 39 de este estudio dentro de ellos, reportados en la base de datos (Tabla 4, Figuras 4 y 5). Los aislados fueron agrupados en los CCs 5, 15 y 23, a excepción del NST-7 que no agrupó en ninguno. El ST8 agrupó en el CC5 en donde se distribuyen STs característicos de comunidad y hospital. En el CC15 agruparon la mayoría de STs encontrados en los aislados locales (reportados y no reportados). El ST15 fundador de este CC ha sido asociado a patologías de comunidad y de hospital. Los STs locales forman parte de subgrupos del ST97 y del ST352 (Figura 5) reportados previamente en animales de granja.

**Tabla 4.** Análisis global eBURST para aislados de *S. aureus*.

<b><i>Staphylococcus aureus</i> en el mundo</b>									
No. de aislados: 4208									
No. de STs= 1835									
No. de réplicas por bootstrapping= 1000									
No. de <i>loci</i> por aislado= 7									
No. de <i>loci</i> idénticos para la definición de grupo= 6									
No. de grupos= 68									
<b>COMPLEJO CLONAL 5</b>									
No. de aislados: 1143									
No. de STs= 373									
Posible fundadora: <b>ST5</b>									
ST	FRECUENCIA	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap		
							Grupo	Subgrupo	
5	169	122	35	5	210	3.87	93%	100%	
8	203	106	61	29	176	3.65	40%	100%	
<b>COMPLEJO CLONAL 15</b>									
No. de aislados: 792									
No. de STs: 317									
Posible fundadora: <b>ST15</b>									
ST	FRECUENCIA	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap		
							Grupo	Subgrupo	
15	84	70	11	5	230	4.24	86%	100%	
97	60	42	19	57	198	3.74	11%	100%	
188	38	19	26	94	177	4.0	3%	100%	
352	48	11	37	36	232	4.21	0%	65%	
NST-3	1	8	37	39	232	4.23	0%	12%	
NST-4	7	5	12	39	260	4.90	0%	24%	
126	4	5	2	28	281	5.00	0%	55%	
1476	7	4	46	30	236	4.44	0%	3%	
NST-8	1	4	17	52	243	4.53	0%	5%	
NST-1	1	3	22	82	209	4.31	0%	0%	
NST-9	1	2	5	28	281	5.01	0%	0%	
NST-6	1	2	5	16	293	5.08	0%	0%	
NST-12	1	1	8	29	278	4.73	0%	0%	

NST-2	1	1	6	39	270	4.77	0%	0%
NST-10	1	1	5	29	281	5.02	0%	0%
NST-5	1	1	4	18	293	5.11	0%	0%

**COMPLEJO CLONAL 23**

No. de aislados: 49

No. de STs: 7

Posible fundadora: 479

ST	FRECUENCIA	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap Grupo	Subgrupo
479	43	6	0	0	0	1.0	99%	94%
NST-11	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%

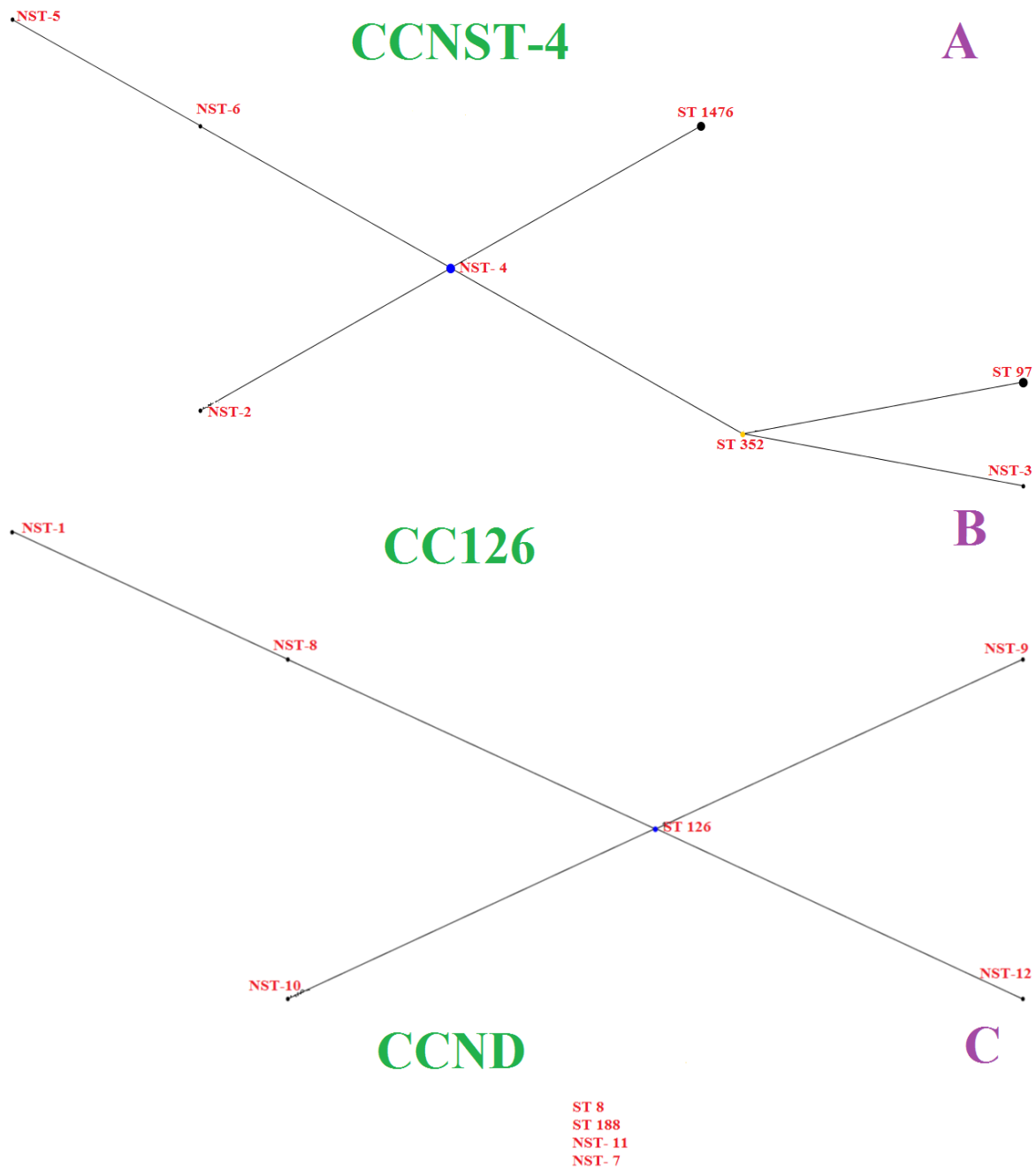
**NO AGRUPADOS**

NST-7

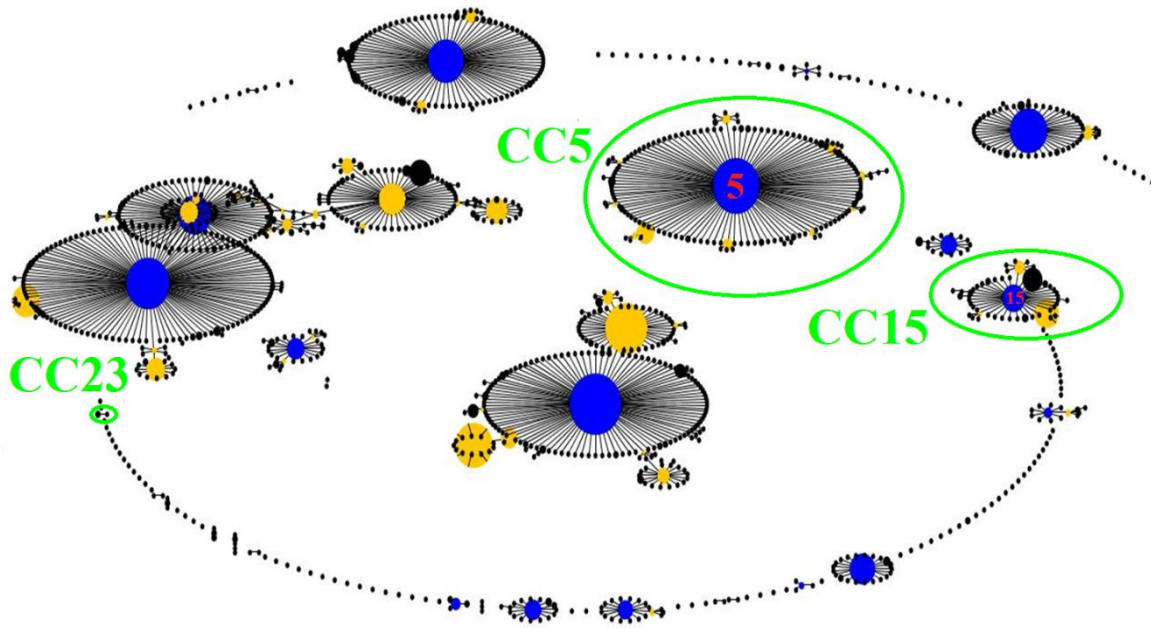
---

ST, secuencia tipo; SLV, variante de un solo *locus*; DLV, variante de doble *loci*; TLV, variante de tres *loci* y SAT, secuencia satélite

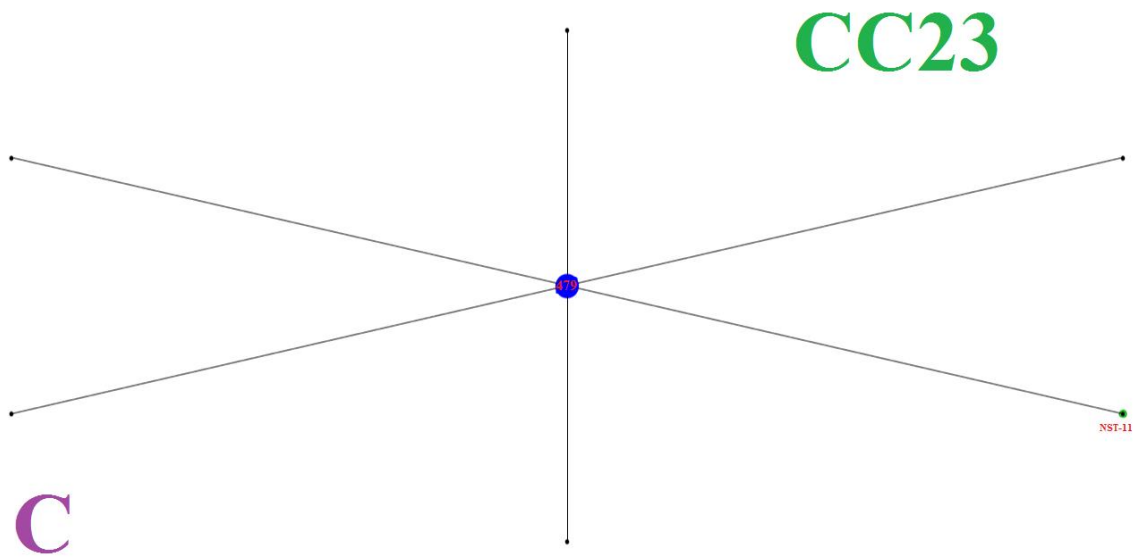
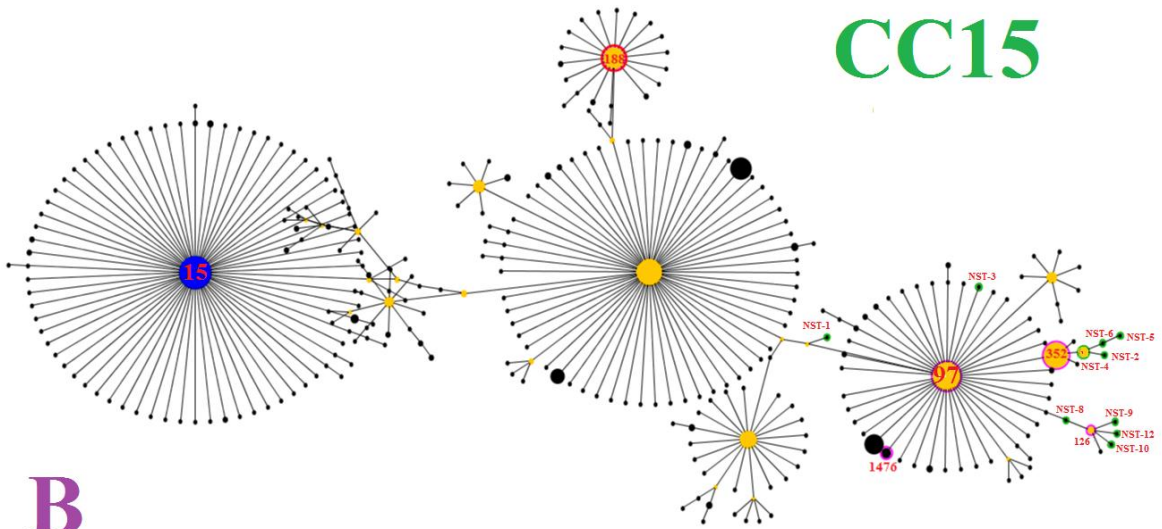
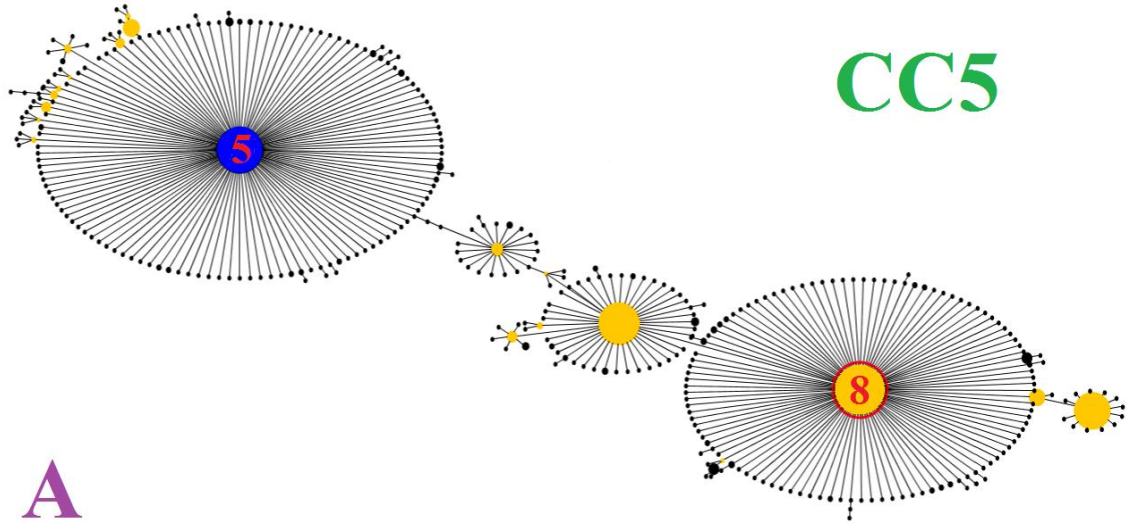




**Figura 3.** Agrupamiento de los aislados de la región de Tarímbaro y complementarios en Complejos Clonales (CC). Se forman 2 Complejos Clonales de acuerdo al algoritmo eBURST En A, complejo clonal NST-4; B, CC126 y en C, CC no definidos.,



**Figura 4.** Ubicación de los aislados en el contexto mundial. Los aislados de nuestro estudio se ubican en 3 Complejos Clonales señalados en verde. Los STs 5,15 y 479 se predice son los fundadores de esos grupos, y han sido asociados a patologías de comunidad y hospital en humanos.



**Figura 5.** Complejos Clonales definidos para los aislados de *S. aureus* locales en el contexto mundial. En el panel A, se observa CC5 (ST8), en B, CC15 (aislados locales en su mayoría) y en C, CC479 (NST-11).

La identificación de STs como factores determinantes para la prevalencia de mastitis bovina, en su forma clínica y subclínica, se realizó con un análisis de  $\chi^2$  en el que se incluyeron los datos de los 19 aislados de Tarímbaro 2008 (Tabla 5). Sólo el ST1476 tuvo relación con la mastitis subclínica, este ha sido aislado de cerdos. En el caso de la mastitis clínica los STs 188, NST-1 y NST-12 fueron los que tuvieron una asociación estadística considerable ( $P < 0.001$ ).

**Tabla 5.** Asociación de los STs regionales como factores determinantes para la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México.

Secuencia Tipo (ST)	Mastitis Subclínica (P)	Mastitis clínica (P)
ST1476	0.0458	0.8145
ST126	0.1045	0.8488
ST188	0.3816	<0.001
ST352	0.2531	0.8932
NST-1	0.3816	<0.001
NST-4	0.2531	0.8932
NST-7	0.2531	0.8932
NST-8	0.2531	0.8932
NST-9	0.2531	0.8932
NST-10	0.2531	0.8932
NST-11	0.2531	0.8932
NST-12	0.3816	<0.001

## DISCUSIÓN

La discriminación de cepas de diferente origen o del mismo linaje a través de técnicas moleculares permite hacer observaciones respecto a la evolución, epidemiología y diseminación de clonas de particular importancia en la salud pública, como cepas de *S.*

*aureus* resistentes a meticilina específicas de hospital, de comunidad y asociadas a animales (Grundmann *et al.*, 2010).

En este estudio se caracterizaron molecularmente aislados de *S. aureus* de casos de mastitis bovina, clínica y subclínica, de humanos involucrados en actividades pecuarias y fomites de granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán, México.

Mediante MLST se lograron identificar 18 Secuencias- Tipo (STs) de los cuales 12 no han sido antes reportados. Los alelos presentaron una diversidad nucleotídica esperada en base a la tasa de mutaciones puntuales en cada una de las secuencias. Sin embargo, la variación en los alelos *aroE*, *glpF* y *gmk* dio origen a alelos nuevos en dos de las regiones en estudio. En el caso de *aroE* la diversidad puede ser consecuencia del fenómeno de “hitchhiking”, [traslado] acarreado por la alta presión de selección a la que está sujeto el gen *clfB*, que es un factor de virulencia que codifica para factor de agregación B, ya que *aroE* y *clfB* se encuentran en *loci* cercanos en el genoma (Cooper y Feil, 2004). La diversidad de STs señala un grupo de aislados de *S. aureus* con características regionales, que señalan en su mayoría genotipos asociados a animales (ST97, ST352 de origen bovino y ST1476, de origen porcino). En Tarímbaro el ST1476 parece ser el más prevalente. El ST8 tiene su origen en la comunidad abierta. El ST188 ha sido descrito para humanos de riesgo nosocomial.

El NST-4 parece ser el ST con mayor adaptabilidad para colonizar diferentes hospederos ya que se encontró en vacas con mastitis, humano involucrado en actividades pecuarias y en fomites. Resulta interesante su asociación con el ST97, descrito para bovinos (Hata, 2010; Herron- Olson *et al.*, 2007). Los humanos involucrados con las actividades pecuarias, que incluyen la manipulación de animales de granja y de procesos de la ordeña, se encuentran en mayor riesgo de transmisión de *S. aureus* de origen animal, potencializando el riesgo de padecer alguna patología de comunidad.

La relación filogenética de los aislados (Figura 1) indica una cercanía evolutiva entre los STs que han sido identificados en animales (ST97, ST1476 y NST-4) y un agrupamiento

distinto para la mayoría de los STs nuevos. El NST-6 no se comporta de la misma forma, a pesar de pertenecer al mismo CC que el resto (Tabla 3), esto pudiera ser por algún evento de recombinación genética y no de alguna mutación puntual, ya que de acuerdo al perfil alélico, sólo existe diferencia en un alelo con los aislados más cercanos del CC (Spratt *et al.*, 2001).

Los aislados de las tres regiones y de diferente origen se agruparon de acuerdo al perfil alélico y se predijo como clona fundadora, el genotipo NST-4 (Figura 2). Los 5 grupos de aislados convergen en el NST-4, evidenciando su poder de adaptabilidad y posible rol como fundador. Los grupos de aislados con NST-11 y ST188 parecen ser los menos relacionados con NST-4, el primero presenta una combinación de alelos completamente diferente al resto de los aislados; el segundo de ellos, es un ST descrito en patologías riesgo nosocomial en humanos. El análisis eBURST con sólo los aislados del municipio de Tarímbaro y las otras 2 regiones complementarias (Tabla 3) muestran una distribución de los STs en 2 Complejos- Clonales (CCNST-4 y CC126) que coinciden con al análisis filogenético (Figura 1). Los STs nuevos sólo se presentaron en los aislados del 2008, lo cual podría indicar una diversificación directa del ST97 del 2004. El ST8 no fue prevalente en la región de Tarímbaro probablemente por la falta de adaptabilidad en el medio ambiente al interior de la glándula mamaria de la ubre pues es un genotipo asociado a patologías clínicas y de comunidad abierta en humanos (Diep y Otto, 2008).

Las posibles clonas fundadoras son aquellas con NST-4 y ST126 para el CCNST-4 y CC126 respectivamente. En el caso del NST-4 es difícil señalar el origen de la clona fundadora pues es representativo de muestras de leche de bovino, humano y fomite, además, la ruta de transmisión no fue descrita en este trabajo. Sin embargo, el NST-4 comparte alelos con el ST97, de origen bovino, genotipo que pudo dar origen a la variante genética local (NST-4) con mayor adaptabilidad o transmisibilidad entre hospederos. La falta de agrupación en CC de algunos STs (8, 188, NST-7 y NST-11) indica poca relación evolutiva y/o epidemiológica con el resto de los STs.

A nivel mundial (Figuras 4 y 5) los aislados de las regiones estudiadas se agrupan en los CCs 5, 15 y 23, y un singlotón, NST-7 que no se agrupa con ningún CC. El CC5 agrupa a STs de origen nosocomial y de comunidad principalmente, además de las clonas pandémicas Nueva York, Japón y pediátrica. En este grupo sólo los aislados del ST8 de origen bovino del 2004 estuvieron presentes. El CC15, representado por su clona fundadora típica de infecciones de nosocomiales y en algunos casos de infecciones de comunidad. Los STs de las regiones en estudio se integran en este CC. La mayoría de STs regionales forman un subgrupo derivado del ST97 (Figura 5). El CC23, por su parte, sólo se integra por 7 STs con los cuales el NST-11 comparte 5 alelos.

Una vez conocidos los genotipos prevalentes en la región era relevante conocer cuál es su implicación con la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México (Tabla 5). En el caso de las mastitis en su forma subclínica el ST1476 fue el único ST asociado, este ST ha sido descrito en aislados meticilina resistentes en cerdos, lo cual puede explicar su alta prevalencia en las diversas regiones. Los STs 188, NST-1 y NST-12 fueron altamente asociados a la mastitis clínica, el ST188 en este estudio se encontró en muestras de origen humano y bovino. El humano no era personal directo de la granja, pues sólo prestaba los servicios veterinarios, sin embargo, tenía historia clínica de haber estado hospitalizado años antes, dato interesante pues el ST188 ha sido descrito para patologías de origen nosocomial.

El hallazgo de genotipos de *S. aureus* típicos de bovinos en humanos y de humanos en bovinos evidencia el riesgo zoonótico que implican las prácticas de manejo de los animales en granjas familiares para la transmisión y diseminación de éste patógeno.

## **CONCLUSIONES**

Los aislados de *S. aureus* analizados fueron de distinto origen geográfico y epidemiológico. No se obtuvo ningún aislado de humano involucrado directamente con el manejo de las vacas al interior de los establos, pero sí se obtuvieron muestras de humanos involucrados con actividades pecuarias (servicios veterinarios) que fueron analizadas.

Se encontraron 12 STs nuevos (8 para el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México) y 6 STs reportados en animales domésticos. Los STs nuevos fueron en su mayoría variantes de 1, 2 o incluso 3 *loci* del ST97, ST compuesto por su mayoría de aislados de origen bovino. Los alelos que presentaron mayor variabilidad fueron *aroE*, *gmk*, *tpi* y *yqiL* para los cuales se encontraron nuevas variantes en aislados de Tarímbaro y Toluca (*aroE*, *glpF*, y *gmk*).

Los STs con mayor frecuencia fueron ST1476, ST97 y NST-4. Este último parece tener la mayor adaptabilidad a las condiciones climatológicas de las 3 regiones geográficas evaluadas así como a las condiciones del hospedero, ya que se encontró en muestras de bovino, humano y en fomite.

Algunos STs presentes en la región de Tarímbaro presentaron relación con la mastitis bovina; en el caso de la mastitis subclínica el ST1476 y en el caso de la mastitis clínica ST188, NST-1 y NST-12. Todos estos STs a nivel global agrupan en el CC15 con aislados de origen animal, clínico y de comunidad.

La presencia del ST8 en bovinos y del NST-4 en humanos señala el riesgo de transmisión de *S. aureus* entre bovinos y humanos evidenciando el riesgo zoonótico causado por esta bacteria en las granjas familiares de producción lechera.



## LITERATURA CITADA

Amorim, M. L., Faria, N. A., Oliveira, D. C. Vasconcelos, C., Cabeda, J. C., Mendes, A. C., Calado, E., Castro, A. P., Ramos, M. H., Amorim, J. M., de Lencastre, H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese Hospital. J. Clin. Microbiol. 45, 2881 –2888.

Bae, I.N., Kim, J.S., Kim, S., Heo, S.T., Chang, C., Lee, E.Y. 2010. Genetic correlation of Community- Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains from carriers and from patients with clinical infection in one region of Korea. J. Korean Med. Sci. 25, 197 -202.

Blanco, O.M.A. 2001. Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. Memorias del III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 21 al 23 de junio, León, Guanajuato, México.

Diep, B.A., Otto, M. 2008. The role of virulence determinants in community- associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol. 16, 361 -369.

Dixon, R. E. 1995. Cost of nosocomial infections and benefits of infection control programs. In Prevention and control of nosocomial infections. ed Wenzel R. P. (The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md), pp 19 -25.

Enright, M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 38, 1008 -1015.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). P. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 7687 –7692.

Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B. G., Moore, C. E., Day, N.P. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? J. Bacteriol. 185, 3307 –3316.

Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., Berche, P. 2000. Evaluation of CHROMagar Staph.aureus® a new chromogenic medium for presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 38, 1587 -1591.

Grundmann, H., Aanensen, D.M., van den Wijngaara, C.C., Spratt, B.G., Harmsen, D., Friedrich, A.W. 2010. Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular- epidemiological analysis. PLoS Med. 7, e1000215.

Hamdan, P. A., Sainz, E. T., Bustos, M. J. 2010. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. J. Clin. Microbiol. 48, 1701 -1705.

Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., Eguchi, M. 2010. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to Methicillin-Resistant isolates from humans. J. Clin. Microbiol. 48, 2130 – 2139.

Horan, T. C., Gaynes, R. P., Martone, W. J., Jarvis, W. R., Emori, T. G. 1992. CDC definitions of nosocomial surgical site infections 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 17, 780 –785.

Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev. 10, 505 -520.

Leonard, F.C., Markey. B.K.2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. Vet. J. 175, 27 -36.

Lowder, B.V., Guinane, C.M., Zakour, N.L.B., Weinert, L.A., Morris, A.C., Cartwright, R.A., Simpson, A.J., Rambaut, A., Nübel, U., Fitzgerald, J.R. 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. P. Natl. Acad. Sci. USA. 106, 19545 -19550.

Plozza, K., Lievaart, J.J., Potts, G., Barkema, H. W. 2011. Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. Aust. Vet. J. 89, 41 -46.

Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Dowson, C.G. 2005a. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 43, 4731 -4736.

Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Fox, L.K., Schukken, Y.H., Kruze, J.V., Bradley, A.J., Zadoks, R.N., Dowson, C.G. 2005b. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 43, 4737 -4743.

Spratt, B. G., Hanage, W. P., Feil, E. J. 2001. The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. Curr. Opin. Microbiol. 4, 602 -606.

Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., van Belkum, A., 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 38, 1931 -1939.

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

La mastitis bovina es una de las enfermedades animales de mayor interés en la producción lechera ya que causa grandes pérdidas económicas, por baja en la producción de leche y/o cambios en la calidad de ésta. La búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento y control han sido motivo de investigación, sin embargo, ninguna ha hecho énfasis en la diversidad de cepas de *Staphylococcus aureus* asociadas a la forma clínica de ésta patología.

El análisis de identificación microbiológica clásica no discrimina y no asocia aislados de *S. aureus* directamente con la patología en estudio. Las técnicas moleculares en conjunto con datos epidemiológicos de campo son la herramienta de elección para lograr una plena identificación de la cepa involucrada y definir las características biológicas que le permiten mayor eficiencia en la colonización e infección del hospedero y en su comportamiento epidémico.

En este trabajo se caracterizaron aislados de *S. aureus* de casos de mastitis bovina del municipio de Tarímbaro, Michoacán, México y se compararon con aislados de diferente origen geográfico y epidemiológico. Además se identificaron los factores de riesgo para la prevalencia de mastitis bovina en la región en estudio.

La lechería familiar es la principal actividad pecuaria del municipio de Tarímbaro, Michoacán, México. Las condiciones de producción y tamaño del hato varían de granja a granja (Tabla1, Capítulo 1) sin embargo, las granjas comparten características como la alimentación, las instalaciones y razas de vacas lecheras utilizadas. La prevalencia de mastitis subclínica y clínica encontradas estuvieron por debajo de lo señalado con anterioridad por Hernández (2007).

Los factores de riesgo asociados a la prevalencia de mastitis fueron la pertenencia al establo 10 (único con presencia de *S. aureus* en humanos), el ordeño manual y tener dos ordeñadores. Durante el ordeño manual, y además con limpieza preordeño de la ubre con la

mano sucia y leche de despunte, las vacas son susceptibles de contagio de *S. aureus* a través de las manos del ordeñador (probablemente colonizado con *S. aureus*).

Se ha señalado a *S. aureus* como el patógeno con mayor prevalencia en casos de mastitis bovina. De las 13 granjas en estudio, en dos de ellas no hubo presencia de éste patógeno (establos 7 y 9). En el caso del establo 4 se encontró la mayor prevalencia de *S. aureus* (5 aislados con genotipos distintos asociados a mastitis clínica).

Las características genéticas de los aislados de las 13 granjas en estudio y aislados complementarios (casos de mastitis clínica de Yuriria, Guanajuato, casos de mastitis subclínica de Toluca, Estado de México y de aislados de Tarímbaro del 2004) demostraron que existen ciertos STs y alotipos del gen *coa* asociados fuertemente con la mastitis bovina.

Se lograron identificar 4 alotipos del gen *coa*, siendo el alotipo B el presente en los casos de mastitis clínica, y los alotipos A y D en mastitis subclínica. En el caso del aislado de origen humano se identificó al alotipo A. Estos datos sugieren una participación determinante de este factor de virulencia en la colonización e invasión de la glándula mamaria de las vacas en producción. El alotipo A podría ser un blanco para el diseño de algún fármaco preventivo ya que fue el más prevalente y el presente en el tipo de mastitis que mayores pérdidas económicas causa a la industria lechera.

Con el análisis de secuencias multilocus (MLST) los STs del municipio de Tarímbaro mostraron un patrón y distribución regional. En el municipio existen 9 nuevos STs, que agrupan en 2 complejos clonales (CCNST-4 y CC126) con 4 STs antes reportados en animales domésticos (STs 97, 126, 352 y 1476). La clona fundadora del CC más numeroso parece ser una variante de doble *loci* (DLV) del ST97 altamente distribuido en muestras de leche y el cual se predice que ha existido en rumiantes por más de 50 años (Hata *et al.*, 2010). Los STs que no agruparon en ninguno de los grupos han sido reportados en casos de infecciones en piel en la comunidad abierta y en humanos portadores sanos (Lamers *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011), lo cual resalta nuevamente el potencial zoonótico de dichos aislados.

A nivel global los STs mostraron tener relación genética con aislados de origen clínico. La clona fundadora de los tres CCs en los que agrupan los aislados del estudio han sido reportados para patologías clínicas y de riesgo nosocomial ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)).

La presencia de STs nuevos (producto de nuevas combinaciones de alelos) y por ende, un CC regional, podrían ser indicativo de la capacidad de adaptación de la cepa al ambiente en el interior de la granja y de la misma glándula mamaria. En conjunto con los factores de riesgo propios de cada aislado, el ST se asocia con el tipo de patología que se presenta, ya que los STs regionales NST-1, NST-12 relacionaron con la mastitis clínica. De manera coincidente el alotipo B de *coa* se encontró en el aislado identificado como NST-12.

La identificación de las cepas de *S. aureus* más prevalentes y, posiblemente, las más virulentas permitirá el diseño de nuevos estudios epidemiológicos. La utilización de aislados de *S. aureus* (con información epidemiológica) que representen a los diversos alotipos del gen *coa* y los STs asociados directamente con la mastitis bovina contribuirá en el diseño de estrategias de control biológico, que disminuyan la problemática de esta patología y así, mejorar de la productividad lechera de la región.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

- En el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México la prevalencia de mastitis bovina fue del 44.58%, sin mostrar una diferencia estadística significativa en los dos periodos estudiados.
- El ordeño manual en conjunto con la limpieza preordeña de la ubre con la mano, dos ordeñadores por establo y la presencia de *S. aureus* en el animal y en humanos tienen impacto sobre la prevalencia de mastitis en cualquiera de sus formas.
- En la región de Tarímbaro se encontraron 8 STs nuevos con nuevas combinaciones de alelos y la presencia de nuevas variantes alélicas en *aroE*, *glpF* y *gmk*.
- La presencia de *S. aureus* con ciertas características genotípicas (alotipo del gen *coa* y ST) son factores de riesgo en la granja para la prevalencia de mastitis.
- El alotipo B del gen *coa* y los NST-1 y NST-12 son los que presentan los aislados de *S. aureus* de casos de mastitis clínica, sugiriendo ser los genotipos más virulentos.
- En base a las características genéticas de los aislados de *S. aureus* encontrados en las granjas se identificó a los alotipos del gen *coa* A, B y D, así como a los STs 188, 1476, NST-1 y NST-12 como determinantes para la mastitis bovina en la región.
- Los ST's con mayor frecuencia fueron 1476, 97 y NST-4, siendo éste último el más ubicuo y mejor adaptado a las condiciones ambientales de cada región y las características de los bovinos y humanos como hospederos.
- Los STs que mostraron relación con la mastitis bovina fueron ST 1476 (mastitis subclínica), ST188, NST-1 y NST-12 (mastitis clínica).
- Los aislados de *S. aureus* de la región se agrupan en el complejo clonal (CC15), que agrupa STs de origen animal, clínico y de comunidad.
- La presencia del ST8 en aislados de origen bovino y el NST-4 en aislados de origen humano señala el riesgo de transmisión de *S. aureus* entre los bovinos y los humanos evidenciando el potencial zoonótico de éste patógeno.

## X. PERSPECTIVAS

La caracterización de los aislados regionales permitirá establecer nuevas alternativas de control y prevención de las infecciones por *S. aureus* en la zona del municipio de Tarímbaro, Michoacán.

La identificación de los factores de riesgo para la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro ayudará a los productores a corregir las prácticas de manejo (alimentación, producción, ordeño y prevención) en granja que incrementan la prevalencia de mastitis.

La determinación de la prevalencia de *S. aureus* en el municipio servirá como base para el diseño de nuevos estudios epidemiológicos encaminados al control de éste patógeno.

Los aislados de *S. aureus* que en base a las características genéticas se identificaron como determinantes para la mastitis bovina en la región, son candidatos para realizar estudios de casos y controles en relación a la patogénesis de esta enfermedad, así como en casos de condronecrosis aviar, dermatitis atópica, e infecciones nosocomiales en animales de compañía y recreación así como en patologías de comunidad en humanos.



## XI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Agger, J. F., Noordhuizen J., Willeberg P., van Voorthuysen P, F. 1991. EPISCOPE v. 2.0.
- Amorim, M. L., Faria, N. A., Oliveira, D. C. Vasconcelos, C., Cabeda, J. C., Mendes, A. C., Calado, E., Castro, A. P., Ramos, M. H., Amorim, J. M., de Lencastre, H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese Hospital. J. Clin. Microbiol. 45, 2881 –2888.
- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O. E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., Valdez-Alarcón, J.J., Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. Res. Vet. Sci. 81, 358 -361.
- Angel, A.L.F., Díaz, M.I.J. 2007. Diagnóstico situacional y necesidades reales de las explotaciones lecheras del municipio de Marcos Castellanos, para la producción y obtención de leche con inocuidad. Programa de inocuidad de los alimentos de origen pecuario. CEFPPMAC. Morelia, Michoacán, México.
- Arrieta, M. L. E. 2011. Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ávila, H. M. 2007. Epidemiología. Diseño y análisis de estudios. Editorial Médica Panamericana. Cuernavaca, Morelos, México. Pp. 385
- Baizabal, A.V., Oviedo, B.J., Valdez, A.J.J., Bravo, P.A., Cajero, J.M. 2009. Caracterización funcional de estructuras conservadas de *Staphylococcus aureus* y receptores celulares. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad

Autónoma de México. Cd. Universitaria. México, DF. Mensaje Bioquímico Vol. XXXIII: 181- 200.

Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüsey, D., Schaellibaum, M. 2003. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J. Clin. Microbiol. 41, 767 -771.

Boost, M. V., O' Donoghue, M. M., Sui, K. H. G. 2007. Characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dogs and their owners. Clin. Microbiol. Infect. 13, 731 –733.

Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 164, 116 -128.

Burt, B. A. 2001. Definitions of risk. J. Dent. Educ. 65, 1007 –1008.

Bustos-Martínez J.A., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cadenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed. 17, 287 -305.

Cabrera, C. R., Rincón, V. M., Irigoyen, C. A. 2002. Nuevas perspectivas en el estudio de las infecciones respiratorias agudas. Arch. Med. Fam. 4, 109 -112.

Cano, C.J.P. 2001. Clasificación clínica de mastitis y nuevas alternativas en su tratamiento. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. León, Gto. México. 21 al 23 de junio.

Castañeda, V.H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda, V. M.A., El Sayed, A. 2011. Genotipificación de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas lecheras en México. Revista Científica, FCV- LUZ, Vol. XXI (4): 308- 316.

Castro, O.F., Rojas, P.P., Rodríguez, Ll. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. Agrociencia. 22, 49 -58.

Cuny, C., Kuemmerle, J., Stanek, C., Willey, B., Strommenger, B., Witte, W. 2006. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterization and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill.* 11, 44 -47.

Diederens, B. M., Kluytmans, J. A. 2006. The emergence of infections with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect.* 52, 157–168.

Dixon, R. E. 1995. Cost of nosocomial infections and benefits of infection control programs. In *Prevention and control of nosocomial infections.* ed Wenzel R. P. (The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md), pp 19 -25.

Enright, M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008 -1015.

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 7687 –7692.

Espinoza G.J.A., Wiggins S., González O.A.T., Aguilar B.U. 2004. Sustentabilidad económica a nivel de empresa: aplicación a unidades familiares de producción de leche en México. *Tec. Pecu. México.* 42, 55 -70.

Evans, S. A. 1976. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. *Yale J. Biol. Med.* 49, 175 -195.

Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B. G., Moore, C. E., Day, N.P. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185, 3307 –3316.

Feil, E. J., Enright, M. C. 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 308 -313.

Foster, T.J. 2004. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *J. Clin. Invest.* 114, 1693 –1696.

Fox, L. 2002. Mastitis por *Staphylococcus aureus*: factores críticos asociados con infecciones. Memorias del III Congreso Mundial de la Leche. León, Guanajuato, México.

Foxman, B. 2007. Contributions of Molecular Epidemiology to the Understanding of infectious disease transmission, pathogenesis, and evolution. *Ann. Epidemiol.* 17, 148 -156.

Gilot, P., Lina, G., Cochard, T., Poutrel, B. 2002. Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA III- Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4060 -4067.

Hamdan, P. A., Sainz, E. T., Bustos, M. J. 2010. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1701 -1705.

Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., Eguchi, M. 2010. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to Methicilin-Resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2130 – 2139.

Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, TJGM. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* 59, 16 -23.

Horan, T. C., Gaynes, R. P., Martone, W. J., Jarvis, W. R., Emori, T. G. 1992. CDC definitions of nosocomial surgical site infections 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17, 780 –785.

INEGI. 2004. Encuesta industria mensual (EIM). Disponible en: [www.inegi.org.mx/](http://www.inegi.org.mx/). Consultado el: 2 de abril de 2011.

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tarímbaro, Michoacán de Ocampo.

INEGI, 2010. Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Disponible en: [www.inegi.org.mx/](http://www.inegi.org.mx/). Consultado el: 28 de abril de 2011.

Jaramillo, A. C.J., Martínez, M. J.J. 2010. Epidemiología. Manual Moderno. México, D.F. pp. 198.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111 -120.

Laza, V. C. 2006. La causalidad en epidemiología. *Investigaciones Andina* [en línea] 2006, [citado 2011-08-21]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx>

Leonard, F.C., Markey. B.K.2008. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Vet. J.* 175, 27 -36.

Lindsay, J. A. 2008. *Staphylococcus* molecular genetics. Caister Academic Press. Great Britain. Pp. 278

Lopez-Meza, J.E., Higuera-Ramos, J., Ochoa-Zarzosa, A., Chassin-Noria, O., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V.M. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Tec. Pecu. Méx.* 2006. 44, 91 -106.

Magaña C. B., Montañez A. V. 2005. Caracterización del sistema lechero en las comunidades Exhacienda La Magdalena, Santa Ana del Arco y El Lometón, Municipio de

Tarímbaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México.

Malachowa, N., Sabat, A., Gniadkowski, M., Krzyszton-Russjan, J., Empel, J., Miedzobrodzki, J., Kosowska-Shik, K., Appelbaum, C.P., Hryniewicz, W. 2005. Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, spa Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates. J. Clin. Microbiol. 43, 3095 –3100.

Murray, R.P., Baron, J.E., Jorgensen, H.J., Landry, L.M., Pfaller, A.M. 2007. Manual of Clinical Microbiology. 9<sup>th</sup> Edition. ASM PRESS. Washington, D.C. pp. 2256

Norma Oficial Mexicana. NOM-184-SSA-2002. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Norma Oficial Mexicana. NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.

Petersson, W.S.C., Mullarky, I.K., Jones, G.M. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection and control. Produced by Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University.

Philpot, W.N. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. En: Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores. p 49-84. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias; UFOCO S.A.

Phuektes, P., Browning, F. G., Anderson, G., Mansell, D. P. 2003. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

*agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. J. Dairy Res. 70, 149 -155.

Putt, S.N.H., Shaw, A.P.M., Woods, A. J., Tyler, M., James, A. D. 1987. Veterinary epidemiology and economics in Africa - A manual for use in the design and appraisal of livestock health policy. FAO

Radostis, O. M., Gay Clive C., Blood., D. C, Hinchliff., K. W. 2002. Medicina Veterinaria; tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. (90 ed.) (vol. 1). Ed. McGraw–Hill Interamericana. Madrid, España, pp 738-752.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2584 -2589.

Riley, L. W. 2004. Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. Principles and Practices. ASM Press. Washington D. C. pp. 348.

Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E., 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J. Dairy Sci. 77, 3354 – 3364.

Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J. L. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in central California dairies. J. Dairy Sci. 85, 132 -138.

Rothman, J. K., and Greenland, S. 2005. Causation and Causal Inference in Epidemiology. Am. J. Public Health. 95, 144 –150.

SAGARPA. 2004. Inventario ganadero 2004. Datos técnicos proporcionados por el distrito de desarrollo rural 092, Morelia, Michoacán, México.

Sánchez, G.L.G., Solorio, R.J.L., Santos, F.J., Castelán, O.A. 2004a. Determinación de los componentes principales del sistema de lechería familiar en la región centro del Estado de Michoacán, México. In: Abstracts 8th Pan-American Dairy Congress. Pan-American Dairy Federation. Miami Beach, USA. 23-25 June 2004. p. 18.

Sánchez, G.L.G., Solorio, R.J.L., Santos, F.J., Castelán, O.A. 2004b. Tipificación de los sistemas de lechería familiar en la región centro del Estado de Michoacán, México. In: Abstracts 8th Pan-American Dairy Congress. Pan-American Dairy Federation. Miami Beach, USA. 23-25 June 2004. p. 18.

SIAP- SAGARPA. 2009. “Avance mensual de la producción pecuaria. Leche de bovino.” Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/> Consultada el 14 de julio de 2009.

Smyth, S. D., Meaney, J. W., Hartigan, J. P., Smyth, J. C. 2007. Occurrence of *ssl* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* from animal infection. J. Med. Microbiol. 56, 418 -425.

Smyth, S. D., Feil, J. E., Meaney, J. W., Hartigan, J. P., Tollersrud, T., Fitzgerald, R. J., Enright, C. M., Smyth, J. C. 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 58, 1343 –1353.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596 -1599.

Vautor, E., Corinne, J., Chevalier, N., Visomblin, N., Vernet, G., Pépin, M. 2005. Characterization of 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, predominantly from dairy sheep, using four different techniques of molecular epidemiology. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 363 – 368.



Villamar, A.L., Olivera, C.E. 2005. Situación actual y perspectiva de la Producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación general de ganadería. SAGARPA. México.

Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschock, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnostic y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72

Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Gröhn, Y. T., Schukken, Y. H. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J. Dairy Sci.* 84(3): 590-599.

Zadoks, R.N., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., van Belkum, A., 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1931 –1939.

Zadoks, R. N., y Schukken, H. I. 2006. Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. *Vet. Clin. Food Anim.* 22, 229 –261.

## APÉNDICE

REDBIO México 2010

Folio: 625

Tipo de presentación: Cartel

Tema: Otro



### ANÁLISIS DE SECUENCIAS MULTILOCUS DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* ASOCIADOS A MASTITIS BOVINA: PRESENCIA DE UNA SECUENCIA-TIPO EXITOSA EN HUMANOS

Daniela Angel-Andrés (1), Francisco Ramón García-Rodríguez (1), Gerardo Uriel Bautista-Trujillo (1), José Gerardo Barragán-Ista (1), Gaspar Morales-Romero (1), Jaime Amadeo Bustos-Martínez (2), Aída Hamdan-Partida (2), Irma Rentería-Solórzano (3), José Luis Solorio-Rivera (3), Víctor Manuel Baizabal-Aguirre (1), Marcos Cajero-Juárez (1), Alejandro Bravo-Patiño (1), Juan José Valdez-Alarcón \* (1).

\* Autor para correspondencia (Corresponding author) [jjvaldez@umich.mx](mailto:jjvaldez@umich.mx)

1- Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2- Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Campus Xochimilco; 3- Unidad de Servicios de Apoyo al Diagnóstico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

#### RESUMEN (ABSTRACT)

"*Staphylococcus aureus* es un patógeno que causa enfermedades en humanos y animales. Las cepas asociadas a humanos se pueden clasificar en adquiridas en hospital, responsables de infecciones nosocomiales, y adquiridas en comunidad, causantes de infecciones en la población abierta como dermatitis. En animales causa diversas patologías de las cuales destaca la mastitis bovina, enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la producción lechera a pequeña escala. La aparición de métodos de caracterización molecular de aislamientos de *S. aureus* aplicados a estudios epidemiológicos ha permitido establecer la historia evolutiva de este patógeno en la comunidad y evidenciar la variabilidad de los genes de virulencia de acuerdo al hospedero. En este trabajo presentamos la caracterización molecular de aislamientos de *S. aureus* asociados a la mastitis bovina en granjas familiares en el Estado de Michoacán. Se analizaron 42 aislamientos de *S. aureus* de la región de Cotzío-Téjaro mediante MLST, PFGE, spa-typing, así como la determinación del perfil de resistencia a antimicrobianos y polimorfismo de los genes *coa* y *spa*. PFGE presenta el mayor poder discriminatorio y concordancia con MLST y spa-typing. Los genes de virulencia también presentan una distribución en base a los grupos identificados por MLST y PFGE. Se identificaron dos complejos clonales, el CC97, característico de aislamientos de bovinos, y el CC8, asociado a infecciones de humanos, en los cuales se presentó resistencia a metilicina. El hallazgo de aislamientos del CC8 resistentes a metilicina, sugieren que los bovinos pudieran ser reservorios de éste patógeno exitoso en humanos."

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* DE POBLACIONES DE BOVINOS PRODUCTORES DE LECHE Y HUMANOS DE LA REGIÓN DE TARÍMBARO, MICHOACÁN.

Daniela Angel Andrés<sup>1</sup>, José Luis Solorio Rivera<sup>2</sup>, Alejandro Bravo Patiño<sup>1</sup>, Víctor Manuel Baizabal Aguirre<sup>1</sup> y Juan José Valdez Alarcón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. <sup>2</sup>Unidad de Servicios de Apoyo al Diagnóstico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km. 9.5 Carretera Morelia- Zinapécuaro s/n, C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán. Contacto: [danielita\\_angel\\_16@hotmail.com](mailto:danielita_angel_16@hotmail.com), [jjvaldez@umich.mx](mailto:jjvaldez@umich.mx)

### Resumen

La producción de leche es una de las principales actividades pecuarias del municipio de Tarímbaro, Michoacán. La mastitis bovina es una enfermedad que en su forma clínica o subclínica causa pérdidas económicas a ésta industria. *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal de mastitis contagiosa, su reservorio primario es el cuarto de la ubre. *S. aureus* también causa enfermedades en los humanos, algunas adquiridas en la comunidad y otras adquiridas en hospitales (nosocomiales). En Michoacán no existen estudios de epidemiología molecular que evidencien posibles relaciones de transmisión de *S.*

*aureus* entre humanos y animales, lo cual constituye un riesgo de la salud pública. En este trabajo se caracterizaron mediante secuencias multi-locus 27 aislamientos de *S. aureus*, provenientes de vacas positivas a la prueba de California y de exudado faríngeo de humanos involucrados en la producción lechera a pequeña escala en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, así como de casos de mastitis clínica en Yuriria, Guanajuato y Toluca, Edo. de México. Las secuencias obtenidas (176) de los alelos *arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqil* se introdujeron en la base de datos de *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net/>) del Imperial College para compararse con las reportadas hasta ese momento y obtener información relacionada al origen de los aislamientos antes reportados. Se identificaron 9 alelos nuevos (2 *aroe*, 2 *glpf*, 3 *gmk* y 2 *yqil*). Los alelos que mayor diversidad presentaron fueron *aroe*, *gmk* y *yqil*. Se identificaron los ST's 1476 y 97 asociados a bovinos. Se encontraron 8 ST's no antes reportados a los cuales se les asignó un número arbitrario. Con el uso de un árbol de mínima dispersión los aislamientos se agruparon de acuerdo a su origen geográfico en dos grupos. Las secuencias de los alelos (MLST) demuestran que los aislamientos de la región comparten alelos con el ST 97, asociado a bovinos. Los ST's identificados pueden integrarse en el complejo clonal 97.

### Introducción

El estado de Michoacán ocupa el lugar número doce en la producción lechera a nivel nacional. La mastitis bovina en su forma clínica o subclínica causa pérdidas económicas a ésta industria. *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal

de mastitis contagiosa, su reservorio primario es el cuarto de la ubre. *S. aureus* también causa enfermedades en los humanos, algunas adquiridas en la comunidad y otras adquiridas en hospitales (nosocomiales), ambas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados. Se ha estimado que *S. aureus* presenta un 50% de resistencia a antibióticos, principalmente a la meticilina, es decir, que la bacteria sobrevive al ser combatida con esos fármacos (Cabrera *et al.*, 2002; Cuny, 2006; Diederer y Kluytmans, 2006; Enright *et al.*, 2002), incrementándose así el riesgo en la salud animal y humana. Estudios de caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus aureus* de bovinos y humanos mediante MLST han clasificado a éstos en distintos complejos clonales, demostrando así la especificidad de hospedero. Los ST's frecuentes de aislamientos de bovinos son ST97, ST115, ST124, ST126, ST25, ST151 y ST771 (Jorgensen *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2008), agrupados éstos en el CC97. Los CC8, CC30 y CC36 son los principales encontrados en aislamientos de humanos, los cuales presentan ST's 1, 8, 22, 25, 30 y 36 (Blanc *et al.*, 2007; Enright *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2008). En Michoacán no existen estudios de epidemiología molecular que indiquen la diversidad y relación evolutiva de cepas involucradas en la mastitis bovina y aquellas en las enfermedades causadas por éste patógeno en humanos.

### Objetivo

Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* procedentes de vacas con mastitis del municipio de Tarímbaro y aislamientos procedentes de humanos portadores, involucrados con la producción lechera, mediante el uso de secuencias multi-locus (MLST).

### Materiales y métodos

a) *Diseño del estudio.* El número de unidades a muestrear se determinó mediante un estudio observacional transversal. b) *Prueba de campo.* En los establos se realizó la prueba de California de acuerdo a Blanco (2001) y las muestras de leche y exudado faríngeo se conservaron en hielo hasta su análisis en el laboratorio. c) *Aislamiento e identificación de S. aureus.* Se aisló a *S. aureus* en los medios Agar Staphylococcus-110 (S110), Agar sangre (AS) y/o CHROMagar™ Staph. aureus (CSA) (Gaillot *et al.*, 2000). Las pruebas bioquímicas confirmatorias fueron catalasa, coagulasa, hemólisis, fermentación del manitol y la hidrólisis de la gelatina. La identificación se hizo mediante la secuenciación de la región variable 3 del gen de ARNr 16S. d) *MLST.* Se incluyeron 27 aislamientos, 19 de la zona en estudio, 3 de casos de mastitis clínica en Yuriria y 5 de una colección de Toluca. La extracción de ADN se realizó mediante el método modificado de Enright *et al.*, (2000). La amplificación de los fragmentos que codifican para los genes incluidos en el análisis se realizó con las condiciones de Enright *et al.*, (2000). Los productos de PCR se limpiaron con dos métodos, limpieza con solución PEG/NaCl/EDTA (Polietilenglicol 8000 20%, NaCl 2.5 M, EDTA 1mM) y con la combinación de Exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón (fermentas). Las muestras fueron secuenciadas por el método de Sanger (1977) en el Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-Campus Guanajuato. Las

secuencias obtenidas de cada uno de los alelos se introdujeron en la base de datos del MLST para *S. aureus* (<http://saureus.mlst.net/>) del Imperial College para compararse con las identificadas hasta ese momento.

## Resultados

Se obtuvieron los electroferogramas de 176 secuencias correspondientes a 27 muestras para comparar con la base de datos. Los alelos y secuencias tipo (ST) identificados para los aislamientos se muestran en la Tabla 1. Se identificaron 9 alelos nuevos y 8 ST's a los cuales se les asignó un número arbitrario señalado con verde y azul respectivamente.

Tabla 1. Alelos identificados en la base de datos de MLST (Imperial College) para los aislamientos de la región Cótzio- Téjaro. *arcc*, *aroe*, *glpf*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil* designan el alelo, ST la secuencia tipo correspondiente. En negro se muestra el alelo o ST identificado; en verde, los alelos nuevos encontrados; en azul, los ST encontrados no reportados en la base de datos y en café el aislamiento correspondiente.

Tabla 1.

AISLAMIENTO	ST	<i>arcc</i>	<i>aroe</i>	<i>glpf</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqil</i>
MRI- 158		3	1	1		1		1
MRI- 12	1855	3	78	1	88	1	5	1
MRI- 32	97	3	1	1	1	1	5	3
MRI- 170		3		1	1	1		3
MRI- 171		3	78	1	1	1		3
MRI- 180	1856	3	351	1	1	1	5	3
MRI- 150	1476	3	1	1	88	1	5	3
MRI- 22	1476	3	1	1	88	1	5	3
MRI- 33	1476	3	1	1	88	1	5	3
MRI- 149		3	1	1	88	1		3
MRI- 161	1857	3	78	1	88	1	5	3
MRI- 166	1857	3	78	1	88	1	5	3
MRI- 167	1857	3	78	1	88	1	5	3
MRI- 172	1857	3	78	1	88	1	5	3
MRI- 173	1857	3	78	1	88	1	5	3
MRI- 176	1857	3	78	1	88	1	5	3
MRI- 175	1858	3	78	1	251	1	5	3
MRI- 174	1859	3	78	1	88	1	32	3
MRI- 162		3	1	330	88	1		11
MRI- 159		3	1	1	4	1		40
MRI- 147		3	68	1	4	1		40
MRI- 156		3	68	1	4	1		40
MRI- 148	1862	3	350	1	4	1	5	40
MRI- 163	1863	3	68	1	251	1	5	40
MRI- 155		3	1	1	250	1		285
MRI- 152	1865	52	79	54	252	56	32	65
MRI- 177			79	331	252	56		286

Para agrupar a los aislamientos en base al ST al que pertenece cada uno se realizó un árbol de mínima dispersión (Fig. 1) utilizando el algoritmo disponible en

la base de datos de MLST del Instituto Sanger, en Reino Unido. Se observa claramente la formación de 2 grupos (A y B). El grupo A conformado en su mayoría por aislamientos de las localidades de Cótzio y Téjaro y el grupo B por aislamientos de Yuriria y Toluca. El ST 97 parece ser el origen de esta división, ya que la mayoría de los aislamientos comparten por lo menos un alelo.

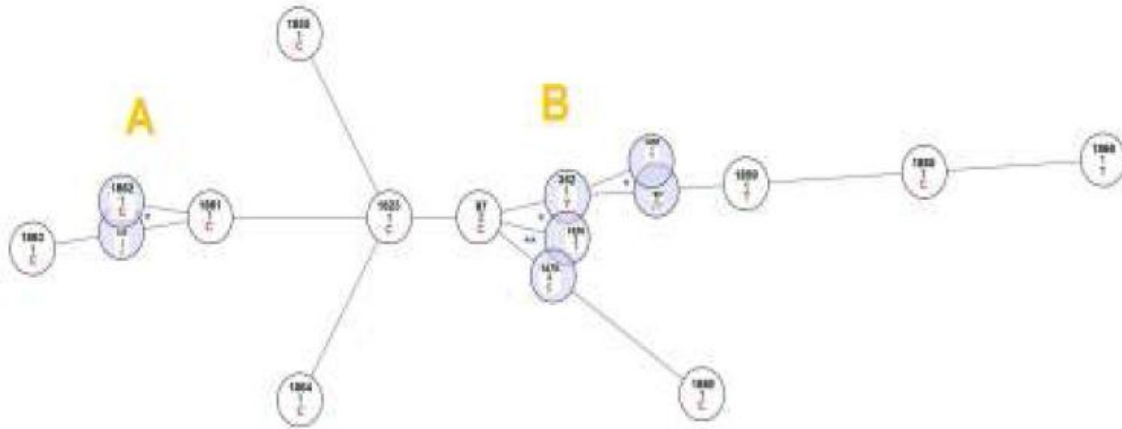


Figura 1. Agrupamiento de los aislamientos en base al ST. Se observa la distribución de los aislamientos en los grupos A y B. El número negro señala el ST correspondiente; el verde, la frecuencia del ST en los aislamientos y la letra roja la región de origen (C, Cótzio- Téjaro; Y, Yuriria y T, Toluca). Los ST's que se traslapan indican que comparten 6 alelos (\*) y 5 alelos (\*\*) respectivamente.

### Discusión

Los alelos ARCC, PTA y TPI fueron los que presentaron menor variación en la secuencia. En GMK se observan 7 alelos de los cuales 3 se cree son nuevos, en el caso de GLPF y YQIL se identificaron 2 nuevos alelos. Para AROE se identificaron 2 alelos nuevos, la diversidad de este alelo puede deberse a la cercanía física de éste gen a algunos bajo presión de selección como lo indicaron Cooper y Feil (2004). Los ST identificados (Tabla 1) hasta el momento corresponden a ST's asociados a animales de acuerdo a la base de datos consultada y lo reportado por Jorgensen *et al.*, (2005).

La distribución de los aislamientos, de acuerdo al árbol de mínima dispersión, (Fig. 1) se da a los aislamientos de acuerdo a su origen geográfico. El grupo A conformado en su mayoría por aislamientos de las localidades de Cótzio y Téjaro y el grupo B por aislamientos de Yuriria y Toluca. Sin embargo, en el ST 1857 se agrupan aislamientos de las 3 regiones. El ST 97 parece ser el origen de esta división, ya que la mayoría de los aislamientos comparten por lo menos un alelo. Cabe señalar que el ST1864 es de origen humano y se separa del resto del grupo.

### Conclusiones

- A nivel regional los alelos *aroe*, *gmk* y *yqil* son los que presentan mayor diversidad.

- Las secuencias de los alelos (MLST) demuestran que los aislamientos de la región comparten alelos con el ST 97, asociado a bovinos.
- Los ST's identificados pueden integrarse en el complejo clonal 97 (CC97) el cual es diverso en los aislamientos de granjas familiares.

### Referencias bibliográficas

- Blanc, D. S., Petignat, C., Wenger, A., Kuhn, G., Vallet, Y., Fracheboud, D., Trachsel, S., Reymond, M., Troillet, N., Siegrist, H., Oeuvray, S., Bes, M., Etienne, J., Bille, J., Francioli, P., Zanetti, G. 2007. Changing Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Small Geographic Area over an Eight-Year Period. *J. Clin. Microbiol.* Vol 45 (11): 3729–3736.
- Blanco O.M.A. 2001. Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. Memorias del III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 21 al 23 de junio, León, Guanajuato, México.
- Cabrera, C. R., Rincón, V. M., Irigoyen, C. A. 2002. Nuevas perspectivas en el estudio de las infecciones respiratorias agudas. *ArchMedFam* 4(3): 109-112
- Cooper, J. E., y Feil, E. J. 2004. Multilocus sequence typing – what is resolved? *TRENDS in Microbiology.* Vol. 12(8): 373- 377.
- Cuny C., Kuemerle J., Stanek C., Willey B., Strommenger B., Witte W. 2006. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterization and comparison with MRSA from humans.
- Diederer, B. M., and J. A. Kluytmans. 2006. The emergence of infections with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect.* 52:157–168.
- Enright M.C., Day N.P.J., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.J. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1008-1015.
- Enright M.C. Robinson D.A., Randle G., Feil E.J., Grundmann H. Spratt B.G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 7687-7692.
- Gaillot O., Wetsch M., Fortineau N., Berche P. 2000. Evaluation of CHROMagar Staph.aureus® a new chromogenic medium for presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J. Clin Microbiol.* 38: 1587-1591.
- Jorgensen H. J., Mork, T., Caugant, D. A., Kearns, A., Rorvik, L. M. 2005. Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* Strains from Norwegian Bulk Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 31 (12): 8352–8361.
- Smith, E. M., Green, L. E., Medley, G. F., Bird, H. E., Fox, L. K., Schukken, Y. H., Kruze, J. V., Bradley, A. J., Zadoks, R. N., Dowson, C. G. 2005. Multilocus Sequence Typing of Intercontinental Bovine *Staphylococcus aureus* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 43 (9): 4737–4743.