



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

## ESTUDIO ECOLÓGICO MOLECULAR DE LA COMUNIDAD DE ENTEROBACTERIAS CULTIVABLES EN GRANJAS DE PRODUCCIÓN LECHERA A PEQUEÑA ESCALA DE LAS COMUNIDADES DE TÉJARO Y COTZIO, MICH.

TESIS

QUE PRESENTA:

M. en F.B. JESÚS ANDREI ROSALES CASTILLO

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN EN:  
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

ASESOR:

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

CO-ASESORA:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS



Morelia, Michoacán, Agosto del 2011.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1 Sistemas de producción de leche	1
I.2 Sistemas de producción de leche en Michoacán	2
I.3 Intercambio de microorganismos dentro y fuera del ecosistema de la granja	4
I.4 Referencias	9
II. HIPÓTESIS	13
III. OBJETIVOS	14
III.1 Objetivo general	14
III.2 Objetivos particulares	14
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
V. RESULTADOS	16
V.1 CAPÍTULO I: Estudio socioeconómico de los sistemas de producción lechera a pequeña escala de las comunidades de Téjaro y Cotzío.	16
V.2 CAPÍTULO II: Estructura y diversidad de la comunidad de enterobacterias cultivables en granjas de producción lechera a pequeña escala en México: una aproximación ecológica en asuntos de salud pública	35

V.3 CAPÍTULO III: Genetic Diversity and Population Structure of <i>Escherichia coli</i> from Neighboring Small-Scale Dairy Farms	77
V.4 CAPÍTULO IV: Grupos filogenéticos, patotipos y resistencia a antibióticos en aislados de <i>Escherichia coli</i> obtenidos de granjas lecheras de producción a pequeña escala	88
VI. DISCUSIÓN GENERAL	117
VII. CONCLUSIONES GENERALES	127
VIII. PERSPECTIVAS	128
IX. REFERENCIAS GENERALES	129

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramos
h	Horas
m	Metros
ml	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	Cloruro de sodio
OTU	Unidad taxonómica operacional
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	Potencial de hidrógeno
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
UTM	Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator (del inglés: <i>Universal Transverse Mercator</i> )

## ÍNDICE DE FIGURAS

### I. INTRODUCCIÓN GENERAL

No	Nombre	Pág.
1	Sistemas de producción ganadera en el estado de Michoacán.	3

### V. RESULTADOS

#### V.1 CAPÍTULO I

	Nombre	
1	Complejos vivienda-granja de las comunidades de estudio.	21
2	Cobertizos de las granjas en las comunidades de estudio.	22
3	Pisos de las granjas en las comunidades de estudio.	23
4	Tipos de ordeña en las granjas de las comunidades de estudio.	24
5	Características de producción de las granjas de estudio.	25
6	Acumulación de excretas del ganado en las granjas de estudio.	26
7	Condiciones de las ubres antes del ordeño.	27

#### V.2 CAPÍTULO II

	Nombre	
1	Localización de las granjas estudiadas.	41
2	Curva de rarefacción para el número de OTUs encontrados en todas las granjas de estudio.	46
3	Agrupamiento de las comunidades bacterianas por granjas y tipos de muestra mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA).	49
4	Dendogramas que muestran las relaciones de las comunidades estudiadas por granjas y tipos de muestra.	50

#### V.3 CAPÍTULO III

	Nombre	
1	Locations of the studied small-scale dairy farms.	79

2	Examples of ethidium bromide-stained agarose (2% w/v) gels showing RAPD profiles obtained from <i>E. coli</i> isolates using the primers Ecorapd.	81
3	Clustering of the studied <i>E. coli</i> strains by Ward's method using the Euclidean distances calculated from the RAPD patterns generated with the primers Ecorapd.	82
4	Genetic landscape shape analysis of <i>E. coli</i> isolates from the studied dairy farms.	83

#### **V.4 CAPÍTULO IV**

##### Nombre

1	Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas.	94
2	Detección y frecuencia de integrones clase 1 en las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas.	95
3	Distribución de subfilogrupos genéticos entre los aislados de <i>E. coli</i> .	96
4	Prevalencia de integrones clase 1 (IC1) en los distintos filogrupos de los aislados de <i>E. coli</i> .	97

#### **VI. DISCUSION GENERAL**

##### Nombre

1	Mapa de la zona de estudio.	118
2	Ciclo de contaminación y abundancia por tipo de muestra de las especies de enterobacterias aisladas de las granjas de estudio.	122

## ÍNDICE DE TABLAS

### V. RESULTADOS

#### V.1 CAPÍTULO I

No	Nombre	Pág.
1	Características socioeconómicas de los productores e infraestructura de las granjas en las localidades de Tájaro y Cotzio.	20
2	Infraestructura, composición del hato y alimentación de los sistemas de producción lechera a pequeña escala de Tájaro y Cotzio.	21

#### V.2 CAPÍTULO II

	Nombre	
1	Número de aislados obtenidos por muestra y por granja de estudio.	42
2	Identificación de las especies de bacterias aisladas de las granjas de estudio.	45
3	Distribución de las especies de enterobacterias aisladas, número de OTUs e índices de diversidad por granja.	46
4	Valores de P de la comparación de pares de ambientes de la prueba de significancia UniFrac-U y UniFrac-W para la comparación de comunidades entre granjas.	47

#### V.3 CAPÍTULO III

	Nombre	
1	Management and husbandry practices at the studied small-scale dairy farms and the relationships between farms	79
2	Number of total isolates, <i>E. coli</i> isolates and RAPD types obtained by farm and by sample type	80
3	Unique and shared RAPD <i>E. coli</i> types by farm and by sample type	83
4	Results of Nei's population analysis of <i>E. coli</i> isolates by farm and by type of sample	83

#### **V.4 CAPÍTULO IV**

Nombre

- |   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | Prevalencia de patotipos diarreagénicos de los aislados de <i>E. coli</i> en relación a subfilogrupos, muestra de procedencia y presencia de integrones clase 1. | 96 |
|---|--|----|

#### **VI. DISCUSION GENERAL**

Nombre

- |   |  |     |
|---|--|-----|
| 1 | Cepas compartidas o exclusivas de grupos de granjas. | 121 |
|---|--|-----|



## RESUMEN

En México no se cuenta con información sobre la presencia de enterobacterias patógenas zoonóticas en el ambiente de granjas lecheras. Menos aún se ha evaluado la relación de las prácticas de manejo con la contaminación bacteriana de la leche, en particular de aquellas granjas de producción a pequeña escala, las cuales son muy importantes para la economía familiar en ambientes rurales. Por esto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar a la comunidad de enterobacterias cultivables en el ambiente de granjas lecheras de producción a pequeña escala y encontrar posibles relaciones entre las prácticas de manejo con la dispersión bacteriana y con la contaminación de la leche producida. Se identificaron mediante la combinación de técnicas de genética molecular y microbiología clásica las especies de enterobacterias cultivables más abundantes de 8 granjas de producción lechera a pequeña escala de las localidades de Téjaro y Cotzio pertenecientes al municipio de Tarímbaro, Mich. Se obtuvieron 310 aislados provenientes de muestras de leche (n=71), ubre (n=79), material de cama (n=85) y excretas (n=75). Los aislados obtenidos se identificaron mediante la secuencia parcial del gen de la subunidad 16S de ARN ribosomal como *Escherichia coli* (n=196), *Escherichia fergusonii* (n=2), *Shigella flexneri* (n=40), *Enterobacter cloacae* (n=6), *Enterobacter hormaechei* (n=3), *Enterobacter cowanii* (n=2), *Klebsiella oxytoca* (n=5), *Brenneria rubrifaciens* (n=53) y *Photobacterium luminescens* (n=3). Se discute el riesgo potencial para la salud del ganado y del ser humano de cada una de las especies identificadas. Empleando los paquetes DOTUR y UniFrac las 310 secuencias se agruparon en 60 OTUs, con un mínimo de 2 y un máximo de 19 por granja, y se encontraron grupos de granjas que comparten la estructura de la comunidad, presentándose diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de granjas. Siendo *E. coli* la población mayoritaria en todas las granjas de estudio, se analizó la estructura de la población de esta especie, agrupándose en 54 patrones RAPD a un 95% de similitud. El 85.55% de las cepas mostraron fenotipos de resistencia al menos a un antibiótico, de éstas el 45.5% mostró multiresistencia a antibióticos. Se encontraron integrones clase 1 (IC1) en 43.88% de las cepas. El 20% de las cepas fueron identificadas como ETEC-LT, 8.88% como ETEC-STa, 3.33%

como EPEC, 2.22% como EIEC y 1.66% como ETEC-LT/STa. El filogrupo A fue el más abundante con 67.77% y el B1 el menos abundante con 6.11%. Los resultados sugieren que las condiciones de operación combinadas con el microambiente influyen en la estructura de las comunidades bacterianas de las granjas de estudio. La presencia de patotipos diarreagénicos de *E. coli* en el ambiente, el ganado y la leche de granjas que presentan multirresistencia y portan IC1 implica posibles riesgos de salud pública que deben de ser evaluados para disminuir las probabilidades de diseminación de enfermedades diarreagénicas. Se propone un modelo de dispersión de la comunidad de enterobacterias analizada entre las granjas de estudio y se plantean de manera general algunas propuestas para disminuir los riesgos de contaminación bacteriana en las granjas y las comunidades de estudio.

## SUMMARY

In Mexico does not exist information about the presence of zoonotic pathogenic enterobacteria in small scale dairy farms. In Mexico small scale dairy farms are very important for the familiar economy, but there are no studies about the relation between handling practices and milk contamination in these farms. The main objectives of this study were: a) to characterize the community of enterobacterias in small scale dairy farms, and b) to find possible relations between handling practices and the bacterial dispersion and the contamination of produced milk. A combination of molecular genetics techniques and classic microbiology was used to identify the most abundant culturable enterobacteria species in eight small scale dairy farms from the localities of Tejaro and Cotzio in Tarimbaro, Michoacan. 310 isolates were obtained from milk samples (n=71), udder (n=79), bedding material (n=85) and feces (n=75). The obtained isolates were identified using the partial sequence of the 16S ribosomal RNA subunit gene as *Escherichia coli* (n=196), *Escherichia fergusonii* (n=2), *Shigella flexneri* (n=40), *Enterobacter cloacae* (n=6), *Enterobacter hormaechei* (n=3), *Enterobacter cowanii* (n=2), *Klebsiella oxytoca* (n=5), *Brenneria rubrifaciens* (n=53) y *Photobacterium luminescens* (n=3). The potential risk for cattle and human being health of each one of the identified species is discussed. Using the software DOTUR and UniFrac the 310 sequences were grouped in 60 OTUs, with a minimum of 2 and a maximum of 19 by farm, there were found farm groups that share the community structure, displaying differences statistically significant between each group of farms. *E. coli* were the majority population in all studied farms. The population structure of this species was analyzed grouping itself in 54 RAPD patterns with a 95% of similarity. 85.55% of the strains showed resistance phenotypes at least to one antibiotic. From these strains, 45.5% showed multiresistance to antibiotics. There were found class 1 integrons (IC1) in 43.88% of the strains. 20% of the strains were identified as ETEC-LT, 8.88% as ETEC-STa, 3.33% as EPEC, 2.22% as EIEC and 1.66% as ETEC-LT/STa. The phylogroup A was the most abundant with 67.77% and the less abundant B1 with 6.11%. These results suggest that handling conditions combined with the microenvironment influence in the bacterial community structure of the studied farms. The presence of diarrheagenic pathotypes of *E. coli* in the

environment, the cattle and the milk from farms that exhibit multiresistance and carry IC1 implies possible public health hazards that they must be evaluated to diminish the probabilities of dissemination of diarrheagenic diseases. It is proposed a dispersion model of the enterobacteria community analyzed between all studied farms, and also there are set out some proposals to diminish the bacterial pollution hazards in the farms and the localities of study.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción de leche se practica en todo el territorio nacional, sin embargo, ésta se encuentra concentrada en los estados de Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Veracruz y Guanajuato, los que contribuyen con el 56% de la producción, aunque los tres primeros destacan con una participación del 26% (Wolter *et al.*, 2004). En México, la producción de leche bovina se da en condiciones muy heterogéneas desde el punto de vista tecnológico y socioeconómico. Así, se pueden clasificar cuatro sistemas de producción: el especializado, el semiespecializado, el de doble propósito y el familiar o de traspatio; los cuales contribuyen con 50%, 21%, 29% y 9% de la producción lechera respectivamente (Wolter *et al.*, 2004). No obstante que la producción de traspatio es la de menor aporte cuantitativo, desde un punto de vista sanitario es la que mayor problemática representa, ya que es el sistema que tiene el riesgo más alto de dispersión de enfermedades, debido a los bajos niveles de tecnificación con los que se trabaja.

Debido a la enorme extensión del territorio mexicano y a la gran variedad de ecosistemas que se originan a partir de las diferencias en precipitación pluvial, la altitud sobre el nivel del mar, la humedad con respecto a las masas de mar que rodean a la república y la producción vegetal, no es posible decir que en México se debe utilizar uno u otro sistema de producción lechera. Cada región geográfica del país impone requerimientos severos sobre la producción agrícola y ésta a su vez, sobre la producción de leche (Gutiérrez y Haubi, 2010). A continuación se describen algunas de las características de los distintos sistemas productivos antes mencionados.

### I.1 Sistemas de producción de leche

Especializado. Este sistema se caracteriza por contar con ganado especializado para la producción de leche, principalmente de las razas Holstein y en menor medida de las razas Pardo Suizo y Jersey. 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.

Semiespecializado. En este sistema, aun cuando predomina el ganado de las razas Holstein y Pardo Suizo, no se llega a los niveles de producción del sistema anterior. El ganado se mantiene en condiciones de semiestabulación que se desarrolla 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.

Doble Propósito. Dentro de este sistema predominan las razas Cebuinas y sus cruzas, y el ganado sirve tanto para la producción 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 y con un mínimo de complementos en alimentos balanceados. La ordeña es manual.

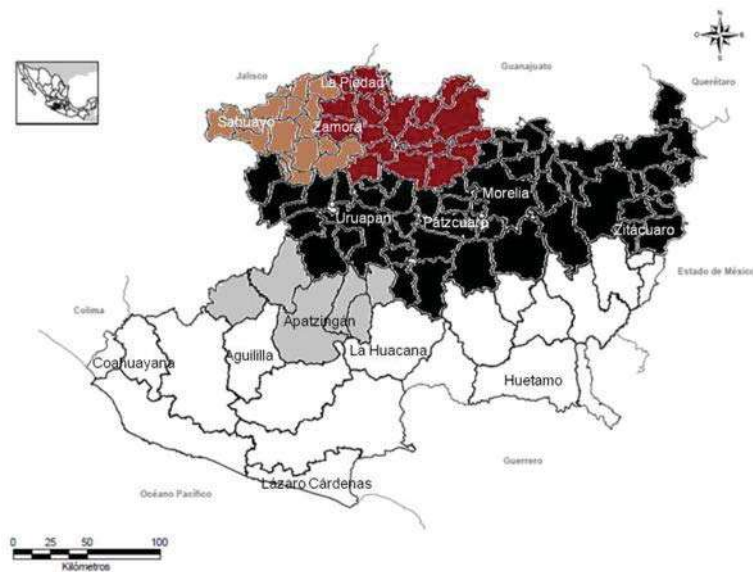
Familiar o de traspatio. Esta actividad se limita a pequeñas extensiones de terreno y cuando el área de producción se ubica cerca de la vivienda se denomina de traspatio. Las razas utilizadas pueden ser tanto Holstein como Suizo Americano y sus cruzas, la alimentación se basa en el pastoreo o en el suministro de forrajes y esquilmos provenientes de los que se producen en la misma granja o en la región (Villamar y Olivera, 2005).

Mientras que el sistema especializado es empleado principalmente por empresas nacionales y transnacionales de gran escala que cuentan con tecnología de última generación, las formas artesanales de producción de pequeña escala del sistema familiar o de traspatio que compiten por el mercado con dichas empresas se caracterizan por ser establecimientos cercanos al nivel de subsistencia y con mínimas posibilidades de reproducción del capital (Bisang, 2005).

## **I.2 Sistemas de producción de leche en Michoacán**

Según datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2009), Michoacán se encuentra en el cuarto lugar a nivel nacional entre los estados con mayor población de ganado bovino en México,

con 1, 812, 663 cabezas de ganado, detrás de Chihuahua y seguido por Oaxaca. Datos oficiales publicados sobre la producción de leche en Michoacán indican que se ubica en el lugar 12 a nivel nacional, con una producción anual de 331,909 litros, representando el 3.14% de la producción en el país (SIAP, 2009). En Michoacán, la producción de leche bovina se sustenta en cinco cuencas lecheras, las cuales incluyen al sistema vaca-becerro del trópico subhúmedo, el de doble propósito del Valle de Apatzingán, el Altiplano Michoacano, la Cuenca lechera de la Ciénega del Chapala y la Cuenca del Bajío Michoacano (Fig. 1).



**Figura 1. Sistemas de producción ganadera en el estado de Michoacán.** □ sistema vaca-becerro del trópico subhúmedo, ■ sistema doble propósito del Valle de Apatzingán, ■ Altiplano Michoacano, ■ Cuenca lechera de la Ciénega del Chapala y ■ Cuenca del Bajío Michoacano.

Cada una de estas zonas de producción posee características climáticas y socioeconómicas especiales que las hacen únicas y que deben ser aprovechadas para incrementar y potenciar la producción de manera que realmente tenga un impacto positivo en los productores y consumidores del Estado. La región productora del municipio de Tarímbaro queda ubicada dentro del altiplano Michoacano, la cual se caracteriza por una alta proporción de unidades de producción de traspatio. Según Méndez y Cazarín et al. (2000) la ganadería en el Estado a lo largo de su historia y en la actualidad siempre se ha desarrollado a

pequeña escala en un sistema de traspatio, tan solo en el Valle Morelia-Queréndaro existen alrededor de 700 unidades de producción de este tipo. Como ya se comentó, dicho modelo de producción es el que mayor necesidad de vigilancia sanitaria presenta, por las posibles repercusiones a nivel de salud pública.

Las acciones orientadas al mejoramiento de la sanidad animal, así como la promoción y certificación de la calidad e inocuidad agroalimentaria, constituyen procesos que favorecen de manera significativa a los productores, ya que redundan en el valor agregado que alcanzan los diversos productos por sector, garantizando la oferta de productos agroalimentarios sanos y de alta calidad para el mercado local, regional, nacional e incluso internacional. La tendencia mundial en el incremento de ciertos estratos de mercado que prefieren comprar productos cuyo origen les garantice una inocuidad derivada de procesos orgánicos, es aún incipiente en México, por lo que es importante apoyar los procesos en ese sentido. Más aún, debe ponerse especial énfasis para que los productores primarios basados en métodos artesanales puedan alcanzar esos nichos de mercado, lo que les permitiría diversificar la entrada de recursos, ya que éstos son siempre los últimos en la cadena de beneficios económicos.

### **I.3 Intercambio de microorganismos dentro y fuera del ecosistema de la granja**

Se ha postulado que las granjas pueden ser consideradas como ecosistemas integrados por distintos compartimentos, siendo los principales compartimentos los humanos que laboran visitan o viven en la granja; los animales de producción, domésticos y silvestres; y el ambiente físico y biológico (Acar y Moulin, 2006). Cada uno de estos compartimentos puede albergar varios nichos, por ejemplo, el compartimento ambiente puede incluir suelo, excretas y cuerpos de agua, entre otros (Acar y Moulin, 2006). Es fácil visualizar cómo la dinámica de un sistema productivo como el de las granjas lecheras permite el traslapamiento o superposición entre nichos y compartimentos, por ejemplo el traslado de las vacas a los bebederos para tomar agua, o la actividad constante de los humanos que laboran dentro de dicho ambiente. En los distintos compartimentos y nichos de una granja puede desarrollarse una comunidad microbiana compleja, incluyendo especies bacterianas



patógenas zoonóticas o potencialmente zoonóticas, y la superposición de nichos antes mencionada es un factor que permite la diseminación de microorganismos dentro de la granja (Acar y Moulin, 2006).

Como ecosistemas abiertos, las granjas lecheras presentan un intercambio de bacterias a nivel local y regional, como resultado de la importación y exportación de ganado. Los microorganismos también entran a la granja al ser transportados por gente, comida nueva para los animales, aves, roedores, insectos, agua y alimento (Sauli *et al.*, 2005). La diseminación de bacterias fuera de la granja sigue múltiples vías, pero el agua residual, los efluentes y el excremento del ganado son los vehículos de diseminación más importantes según los estudios realizados en las granjas de países desarrollados (Oliver *et al.*, 2005a), ya que en estos se han encontrado diversas especies bacterianas y aunque la carga puede ser baja, algunas veces es suficiente para infectar a nuevos huéspedes (Acar y Moulin, 2006). Las bacterias patógenas pueden sobrevivir fuera del hospedero por algún tiempo en el medio ambiente, promoviendo la transmisión a un nuevo hospedero (Winfield y Groisman, 2003). Wang *et al.* (1996) observaron que las heces de bovinos que contienen *Escherichia coli* O157:H7 son una fuente importante de reinfección de los rebaños. Por otro lado, estudios recientes han evidenciado la capacidad de las bacterias patógenas para emplear mecanismos de dispersión no asociados a los vehículos anteriormente mencionados. Así, Davis *et al.* (2003a) estudiaron 30 granjas de ganado bovino en Washington e Idaho, y mediante la aplicación de electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE, por sus siglas en inglés), encontraron evidencia de la transmisión de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella enterica* entre dichas granjas, empleando como vehículo de intercambio el alimento del ganado. Si hay presencia de bacterias patógenas, comensales o zoonóticas en los animales o en el ambiente de las instalaciones a la hora de sacrificarlos, es posible que se inicie una cadena de contaminación que puede alcanzar el sector alimenticio y el consumidor (Collins y Wall, 2004; MacKenzie *et al.* 2004; White *et al.* 2004).

Los estudios de dispersión de *E. coli* asociada a granjas lecheras han mostrado la capacidad de ésta para desplazarse hasta 50 km (Wetzel y LeJeune,

2006), también se ha documentado la dispersión del mismo genotipo de *E. coli* O157:H7 sobre grandes distancias geográficas (Davis *et al.*, 2003b). No obstante, a la fecha no se han realizado estudios de dispersión y relaciones genéticas entre aislados de especies de enterobacterias patógenas distintas de *E. coli*, algo que sería importante para conocer los patrones de dispersión y establecer estrategias de prevención y control de enfermedades zoonóticas.

La producción y el procesamiento de leche segura, libre de microorganismos patógenos, saludable y de alta calidad, obviamente comienza en la granja. La sanidad de la granja influencia la calidad de la leche, sin embargo, la calidad comienza antes de que las vacas sean ordeñadas. La sanidad más que ser una actitud es un proceso. Este proceso incluye ubres sanas, mantenimiento al equipo, prácticas de higiene adecuadas, alimentación de calidad, control de animales y pestes, entre otros (Sigurdson, 2007), ya que las máquinas para ordeñar, los utensilios y el equipo de las granjas utilizados durante la transportación y en los diferentes procesos pueden agregar contaminantes a la leche (Salo *et al.*, 2006). La capacidad de las granjas de producción a pequeña escala para invertir en la mejoría de las instalaciones es mucho más limitada que el de las granjas industrializadas de gran tamaño, resultando en diferencias entre las prácticas en el manejo, equipamiento y regularmente, en el bienestar de las vacas (Haltia *et al.*, 2006). Los productores de hatos grandes adoptan más prácticas de bioseguridad que aquellos de hatos pequeños, pero los riesgos de bioseguridad son comunes (Hoe y Ruegg, 2006).

En el ambiente de las granjas lecheras se ha descrito una gran variedad de especies zoonóticas o potencialmente patógenas del ganado y el ser humano que incluyen a especies dentro de los géneros *Brucella*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Omera *et al.*, 2000; Barkema *et al.*, 2009), entre otros, así como distintas especies de bacterias Gram negativas (Oliver *et al.*, 2005b). En particular, se ha documentado que la leche producida en granjas de producción a pequeña escala en distintos países en vías de desarrollo presenta bacterias patógenas de la familia *Enterobacteriaceae* (Chyea *et al.*, 2004; Kivaria *et al.*, 2006; Getahun *et al.*, 2008). Aunque la presencia de bacterias patógenas en la leche en dichos trabajos se

ha relacionado de manera general con las malas prácticas de manejo, no se ha analizado el ambiente de la granja para buscar establecer relaciones entre la distribución de los patógenos y la contaminación de la leche. En el caso particular de México, no existen trabajos en la literatura especializada reciente en el que se realice un análisis microbiológico de la leche y del ambiente de granjas de producción de pequeña escala. Por lo que en general, en el país se desconoce el riesgo potencial de la aparición de brotes de enfermedades ocasionadas por bacterias patógenas tanto en el humano como en los animales.

Dentro de la región productora del municipio de Tarímbaro se encuentran las localidades de Téjaro y Cotzio, las cuales proveen de un aporte significativo de leche bronca a la ciudad de Morelia. En las granjas lecheras de dichas comunidades se ha reportado la incidencia temporal de brucelosis (Varela, 2002) y tuberculosis (Álvarez, 2002) en el hato. También se ha documentado la presencia de *Staphylococcus aureus* como agente asociado a mastitis clínica bovina (López-Meza *et al.*, 2006). Sin embargo, a la fecha se desconoce la presencia de enterobacterias potencialmente patógenas en las granjas de dichas comunidades. Tampoco existe información actualizada sobre las prácticas de manejo de las granjas de dichas comunidades que puedan representar un riesgo de salud pública en términos microbiológicos. La información generada en ese sentido, junto con los estudios previos, ayudaría tanto a la creación de programas de vigilancia epidemiológica como a la generación de programas de manejo que mejoren la calidad microbiológica de la leche.

El presente trabajo se divide en cuatro capítulos, orientados al estudio de enterobacterias cultivables provenientes de granjas de producción lechera a pequeña escala (granjas de traspatio) del municipio de Tarímbaro, Mich. En el primero se analizan los resultados de encuestas aplicadas a cien productores con la finalidad de conocer mejor las características socioeconómicas de las granjas de producción a pequeña escala en la zona de estudio, para las que no existía información reciente en ese sentido. Además de permitirnos iniciar el contacto con los productores locales, dichas encuestas también posibilitaron nuestra mejor comprensión del sistema productivo y la identificación de prácticas con implicaciones en salud pública, que podía afectar la calidad microbiológica de la leche. Adicionalmente, este primer

contacto con los productores permitió convencer a ocho de ellos para la realización de los estudios microbiológicos en sus granjas. Una vez obtenidos 310 aislados bacterianos en distintas muestras de estas ocho granjas lecheras del área de estudio, se pudo realizar una identificación genético-molecular de éstos empleando el gen de la subunidad 16S de RNA ribosomal. A su vez, esto permitió realizar un análisis de la estructura de la comunidad de enterobacterias cultivables y la comparación de esta por granja y por tipo de muestra. Dicho análisis, el cual se presenta en el segundo capítulo, constituye en una aproximación novedosa en granjas lecheras, en el que se usan herramientas de análisis de ecología molecular bacteriana en problemas de salud pública. En el tercer capítulo se analiza la diversidad genética y la estructura de población de 180 cepas identificadas como *Escherichia coli* de las 310 aisladas inicialmente, provenientes de seis granjas distintas. Este análisis se realizó con marcadores RAPD y además del patrón de agrupamiento, se muestra evidencia de flujo genético entre granjas empleando como herramienta lo que puede traducirse como el “análisis de la morfología del paisaje genético” (*genetic landscape shape analysis*). Al igual que en el capítulo anterior, el empleo de herramientas de análisis de ecología molecular constituye una aportación novedosa del presente trabajo en aspectos de salud pública y epidemiología molecular de granjas de producción lechera. En el cuarto capítulo y último se analizan las mismas cepas de *E. coli* del capítulo anterior en busca de genes de patogenicidad, integrones clase 1, filogrupos y patrones fenotípicos de resistencia a antibióticos. Este tipo de análisis complementa de manera importante los estudios realizados en el capítulo cuatro, ya que permite identificar características genéticas y fisiológicas importantes en términos de salud pública en los aislados de *E. coli* provenientes de granjas lecheras. Los resultados de este último capítulo también constituyen un aporte original importante en granjas lecheras de México, constituyéndose en el primer trabajo en el que se reporta la presencia de patotipos humanos de *E. coli* y la presencia de regiones genéticas asociadas a la resistencia múltiple a antibióticos.

#### I.4 REFERENCIAS

- Acar J. F. and Moulin G. 2006. **Antimicrobial resistance at farm level.** *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizooties)* 25:775-792.
- Álvarez H. H. 2002. **Aspectos epidemiológicos de la tuberculosis bovina en sistemas de producción familiar,** (tesis no publicada, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo)
- Barkema H. W. , Green M. J., Bradley A. J., and Zadoks R. N. **2009. The role of contagious disease in udder health.** *Journal of Dairy Science* 92:4717-4729.
- Bisang R. G. 2005. **Acumulación y tramas agroalimentarias en América Latina.** *Revista de la CEPAL* 87:115-129.
- Chyea F. Y., Abdullah A., and Ayob M. K. 2004. **Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia.** *Food Microbiology* 21:535-541.
- Collins J. D., and Wall P. G. 2004. **Food safety and animal production systems: controlling zoonoses at farm level. In Emerging zoonoses and pathogens of public health concern.** *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizooties)* 23:685-700.
- Davis M. A., Hancock D. D., Rice D. H., Call D. R., Digiacomo R., Samadpour M., and Besser T. E. 2003a. **Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*.** *Veterinary Microbiology* 95:199-210.
- Davis M. A., Hancock D. D., Besser T. E., Rice D. H., Hovde C. J., Digiacomo R., Samadpour M., and Call D. R.. 2003b. **Correlation between geographic distance and genetic similarity in an international collection of bovine faecal *Escherichia coli* O157:H7 isolates.** *Epidemiology and Infection* 131:923-930.
- Getahun K., Kelay B., Bekana M., and Lobago F. 2008. **Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia.** *Tropical Animal Health and Production* 40:261-268.
- Gutiérrez L. J. L. y Häubi S. C. U. 2010. **Menos bocas, más vacas, pasando de la precariedad a la rentabilidad en el campo hidrocaldo.** Ed. Fundación

- ahora, Fundación produce Aguascalientes e INDESOL. Aguascalientes, Aguascalientes, México. P 15-21.
- Haltia L., Honkanen-Buzalski T., Spiridonova I., Olkonen A., and Myllys V. 2006. **A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 estonian dairy herds.** *Acta Veterinaria Scandinavica* 48:22.
- Hoe F. G. H., and Ruegg P. L. 2006. **Opinions and practices of Winsconsin dairy producers about biosecurity and animal well-being.** *Journal of Dairy Science* 89:2297-2308.
- Kivaria F. M., Noordhuizen J. P. T. M., and Kapaga A. M. 2006. **Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania.** *Tropical Animal Health and Production* 38:185-194.
- López-Meza J. E., Higuera-Ramos J. E., Ochoa-Zarzosa A., Chassin-Noria O., Valdez-Alarcón J. J., Bravo-Patiño A., and Baizabal-Aguirre V. M. 2006. **Caracterización molecular de ailamientos de Staphylococcus spp. Asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán.** *Técnica Pecuaria en México* 44:91-106.
- MacKenzie A. A., Allard D. G., Perez E., and Hathaway S. 2004. **Food systems and the changing patterns of food-borne zoonoses. In emerging zoonoses and pathogens of public health concern.** *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizooties)* 23:677-684.
- Méndez y Cazarín M. D., Tzintzun R. R. y Val A. D. 2000. **Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala.** *Livestock Research for Rural Development* 12:2000.
- Oliver S. P., Jayarao B. M., and Almeida R. A. 2005b. **Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety.** Proc. 44th NMC Annual Meeting. Orlando, FL, pp. 3-27.
- Oliver S. P., Jayarao B. M., and Almeida R. A. 2005a. **Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications.** *Foodborne Pathogens and Disease* 2:115-129.

- Omera M. K., Skjerveb E., Woldehiwet Z., and Holstad G.. 2000. **Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea.** *Preventive Veterinary Medicine* 46:257-265.
- Omoro A., Muriuki H., Kenyanjui M., Owango M., and Staal S. J. 1999. **The Kenya dairy sub sector: a rapid appraisal**, (Smallholder Dairy (Research & Development) Project Report, ILRI, Nairobi).
- SAGARPA-Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2009. [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovlech.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovlech.pdf) (18 de junio del 2011)
- Salo S., Ehavald H., Raaska L., Vokk R., and Wirtanen G. 2006. **Microbial surveys in Estonian dairies.** *LWT-Food Science and technology* 39:460-471.
- Sauli I., Danuser J., Geeraerd A. H., Van Impe J. F., Rufenacht J., Bissig-Choisat B., Wenk C., and Stark K. D. 2005. **Estimating the probability and level of contamination with *Salmonella* of feed for finishing pigs produced in Switzerland: the impact of the production pathway.** *International Journal of Food Microbiology* 100:289-310.
- SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2009. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=371](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=371) (18 de junio del 2011)
- Sigurdson C. G. 2007. **Practical hygiene and disinfection on dairy farms.** [www.cvm.umn.edu/img/assets/9090/sigurdson%20proc.pdf](http://www.cvm.umn.edu/img/assets/9090/sigurdson%20proc.pdf). (12 de junio del 2007).
- Varela M. A. I. 2002. Aspectos epidemiológicos de la Brucelosis bovina en sistemas de producción familiar. (tesis no publicada, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo)
- Villamar Á. L. y Olivera C. E. 2005. **Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005.** Coordinación General de Ganadería, SAGARPA. México. Pág. 4.



- Wang G., Zhao T., and Doyle M. P. 1996. **Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces.** *Applied and Environmental Microbiology* 62:2567-2570.
- Wetzel A. N., and LeJeune J. T. 2006. **Clonal dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 subtypes among dairy farms in Northeast Ohio.** *Applied and Environmental Microbiology* 72:2621-2626.
- White D. G., Zhao S., Singh R., and McDermott P. F. 2004. **Antimicrobial resistance among gram-negative foodborne bacterial pathogens associated with foods of animal origin.** *Foodborne Pathogens and Disease* 1:137-152.
- Winfield M. D., and Groisman E. A. 2003. **Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*.** *Applied and Environmental Microbiology* 69:3687-3694.
- Wolter W., Castañeda H. V., Clopper B. y Zschöck M. 2004. **Mastitis bovina prevención, diagnóstico y tratamiento.** Ed. Universitaria de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. p 16-18.



## **II. HIPÓTESIS**

Las granjas lecheras de producción a pequeña escala de las localidades de Téjaro y Cotzio del municipio de Tarímbaro presentan una comunidad de enterobacterias cultivables diversa, con una estructura semejante entre las granjas de estudio, en la que existe un número significativamente alto de especies patógenas zoonóticas que llegan la leche producida debido a las prácticas de manejo.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 Objetivo general**

Caracterizar la comunidad de enterobacterias cultivables presentes en las granjas de producción a pequeña escala (traspatio) de las localidades de Téjaro y Cotzío del municipio de Tarímbaro, Mich. y establecer posibles relaciones entre ésta y las prácticas de manejo que redunden en la contaminación de la leche.

#### **III.2 Objetivos particulares**

Realizar una descripción actualizada de las prácticas de manejo y las características socioeconómicas de las granjas de producción a pequeña escala de las localidades de Téjaro y Cotzío del municipio de Tarímbaro, Mich.

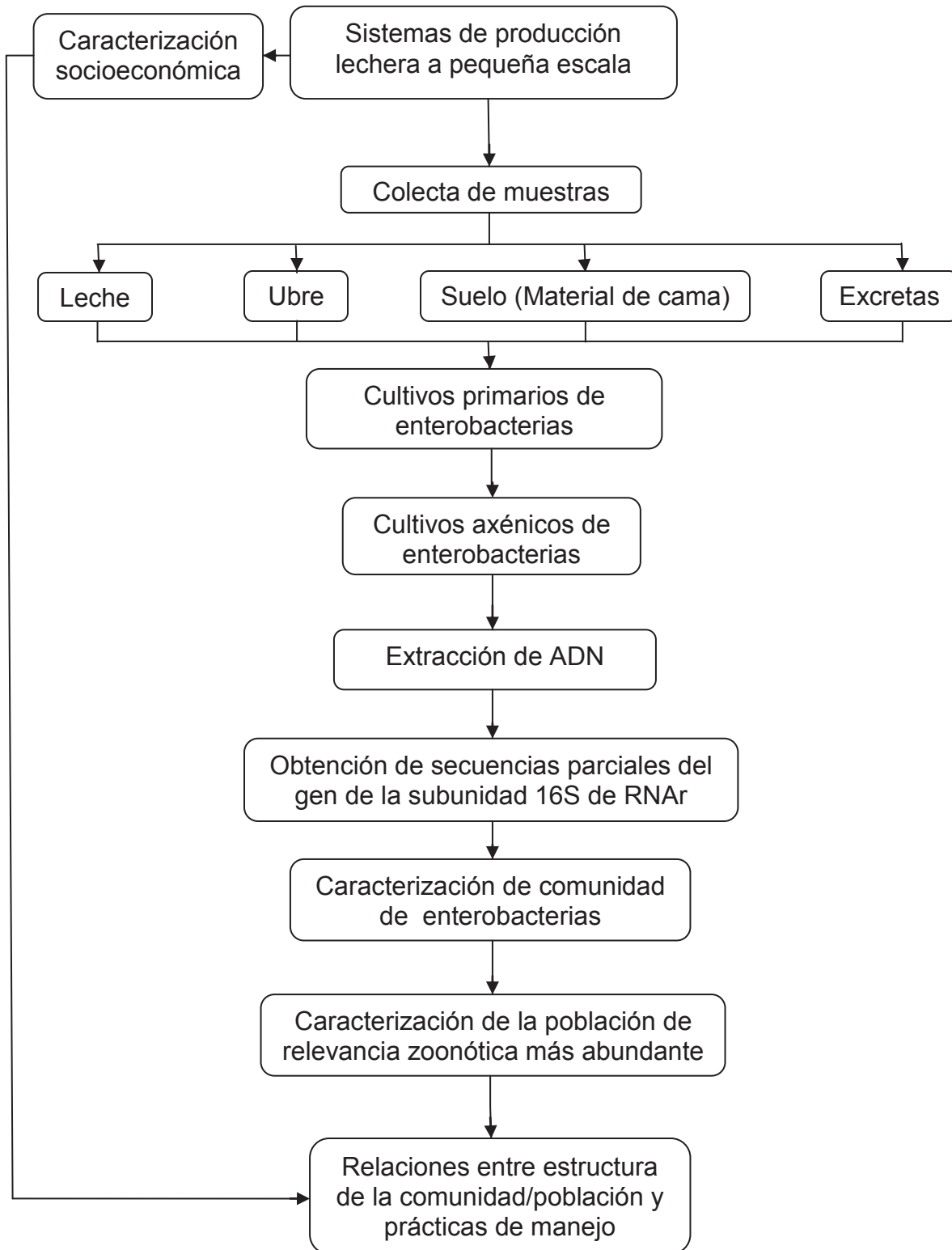
Identificar las especies de enterobacterianas más abundantes en los sistemas de producción a pequeña escala (traspatio) de las localidades de Téjaro y Cotzío del municipio de Tarímbaro, Mich.

Analizar la estructura de la comunidad de enterobacterias del ambiente de la granja.

Caracterizar a la población bacteriana de relevancia zoonótica más abundante en la comunidad analizada.

Establecer posibles relaciones entre las prácticas de manejo y la contaminación de leche por enterobacterias de la comunidad analizada.

#### IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **V. RESULTADOS**

### **V.1 CAPÍTULO I**

#### **ESTUDIO SOCIOECONÓMICO DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN LECHERA A PEQUEÑA ESCALA DE LAS COMUNIDADES DE TÉJARO Y COTZIO**

##### **Resumen**

Con el propósito de describir las características sociales, económicas y tecnológicas de los sistemas de producción lechera a pequeña escala que existen en la región del altiplano michoacano, en el centro de México, y comparar los resultados con los reportados para sistemas similares en otras zonas de México, se aplicaron 100 encuestas a dueños de sistemas productivos de la región de interés, analizando aspectos como el nivel educativo de los productores, la estructura administrativa, características del hato, manejo y estructura de la granja, producción de leche, y manejo de excretas, entre otros. El análisis de los datos nos permitió determinar que el nivel de escolaridad de los productores es bajo, el sistema es totalmente estabulado con granjas ubicadas generalmente contiguas a la vivienda del productor, con infraestructura básica y un hato promedio de 13.14 vacas en producción, que no hace rentable adquirir sistemas mecanizados de ordeña, por lo que operan con poca o nula innovación tecnológica, ya que el 57% practican la ordeña manualmente y solo el 43% tienen ordeña mecánica. Se tiene una producción promedio de 127.19 litros/día/granja, a un precio de venta a intermediarios de 2.50 a 3.80 pesos mexicanos (0.23 a 0.36 US dólares). El manejo de excretas es diverso, los productores permiten la acumulación desde un día hasta un año dentro de la granja, lo que conlleva el riesgo de contaminación de la leche y el ambiente circundante. El uso de mano de obra familiar y la producción local de forrajes son factores que dan estabilidad a los sistemas estudiados. El bajo número de cabezas en el hato productivo, la falta de incorporación tecnológica y los bajos precios de venta al intermediario, son factores que ponen en riesgo la estabilidad de los sistemas de producción estudiados. El manejo de excretas es un factor que debe ser estudiado con mayor profundidad en los sistemas de producción a pequeña escala en México, por su implicación en salud pública.

### V.1.1 INTRODUCCIÓN

En México, las granjas lecheras de producción a pequeña escala están formadas por sistemas productivos de tipo campesino, los cuales son una alternativa de mejoramiento socioeconómico accesible, ya que necesitan bajo requerimiento de capital y poca o nula mecanización, tienen capacidad para generar ingresos diarios y proveen oportunidades de empleo para las familias, reduciendo la pobreza y la necesidad de emigrar a las ciudades (Arriaga-Jordán *et al.*, 2002; Arriaga-Jordan y Pearson, 2004). Estos sistemas productivos están dirigidos a aprovechar los recursos de familias rurales, como la mano de obra, los cultivos forrajeros y los residuos de cosecha producidos en sus pequeñas parcelas. Se caracterizan por la escasa adquisición de insumos comprados a terceros y mínima inversión para el mejoramiento de su infraestructura. La ventaja de este sistema es su flexibilidad, pues depende poco de insumos externos y tiene bajos costos, lo que lo hace menos vulnerable a variaciones del mercado, lo cual le ha permitido sobrevivir a múltiples crisis económicas y productivas. Un factor limitante de estos sistemas es el alto precio del alimento para el ganado, que representa la mayor parte de los costos de producción (Arriaga-Jordán *et al.*, 2002).

En México, los sistemas de producción lechera a pequeña escala tienen una alta participación en el inventario ganadero por su alta capacidad de adaptación a los diferentes ambientes físicos en distintas regiones del país. Constituyen el 18.9% del hato lechero nacional y generan 35% de la producción de leche en el país (Castro *et al.*, 2001). La leche producida en estos sistemas se destina principalmente al autoconsumo y en ocasiones se vende a intermediarios o directamente al público, lo cual conforma mercados locales o regionales, que llegan a representar 28% de la oferta nacional de leche (García *et al.*, 1999) siendo más numerosos en los estados de Jalisco, Michoacán, Chihuahua, Puebla, México e Hidalgo, aunque se encuentran en menor número en Aguascalientes, Sonora, Oaxaca, Baja California, Tlaxcala, San Luis Potosí y Zacatecas (Castro *et al.*, 2001). Algunos autores han descrito estos sistemas en los estados de Jalisco (García-Muñiz *et al.*, 2007), Tlaxcala (Cesín *et al.*, 2007) y Guanajuato (Espinosa *et al.*, 2004), encontrándose diferencias

principalmente en el número de cabezas del hato, en el número de vacas en producción y en el volumen de producción de leche.

A pesar de la importancia de los sistemas de producción lechera a pequeña escala en México, tanto en términos de su contribución como fuente nacional de leche (Muñoz *et al.*, 1999) como en su potencial para mejorar la obtención de sustento económico principalmente en comunidades rurales, todavía es escaso el conocimiento sobre los factores sociales, económicos y tecnológicos que permitan un mejor entendimiento del funcionamiento de estos sistemas, lo cual posibilitaría aumentar su capacidad productiva (Castelán-Ortega y Matthewman, 1996) así como evaluar el nivel de heterogeneidad existente entre estos sistemas productivos del país, identificando así estrategias específicas de mejoramiento sanitario o productivo de acuerdo a las características particulares de una región. Aunque en el estado de Michoacán se han realizado estudios socioeconómicos en granjas de producción a pequeña escala (Colunga *et al.*, 2009; Méndez y Cazarín *et al.*, 2000), la utilidad de la información aportada es limitada, debido al bajo número de sistemas productivos analizados ya que dichos estudios se han basado en los resultados obtenidos en menos de 10 granjas. Por lo anterior, nuestro objetivo fue describir los sistemas de producción lechera a pequeña escala existentes en la región el centro occidente de México, particularmente en el altiplano del estado de Michoacán.

## **V.1.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Zona de estudio**

El presente trabajo se realizó en las localidades de Tájaro y Cotzio, del municipio de Tarímbaro, Michoacán, ubicadas entre los 19° 45' 00" y 19° 54' 00" de latitud norte y 101° 03' 00" y 101° 19' 00" de longitud oeste, a una altitud de 1883 msnm., situadas a 26 km en dirección noroeste de la capital del estado. El clima de la zona es templado con lluvias en verano. La precipitación pluvial máxima es de 171.5 mm<sup>3</sup> en julio, con un promedio de 56.6 mm<sup>3</sup> en agosto y una mínima de 0.06 mm<sup>3</sup> en enero (Álvarez, 2002). La humedad máxima es del 100%, con registro promedio de 56.6% y un mínimo de 7.1%. Los registros más elevados de temperatura se ubican

durante el mes de mayo (37.5°C), el promedio anualizado es de 17.7°C y las temperaturas más bajas se presentan durante el mes de enero (1.3°C).

La ganadería es la segunda actividad económica en estas localidades, ya que es una cuenca lechera importante en el suministro de este producto a los habitantes de la capital del estado. En las localidades de estudio han sido identificadas 190 granjas lecheras de producción a pequeña escala (Duarte y Ávila, 1997).

### **Recolección de datos**

Se entrevistó a un total de 100 productores a pequeña escala con base en el cuestionario estructurado por Nordlund et al. (2007). Los cuestionarios fueron aplicados mediante visitas a las granjas entre mayo y junio del 2008, capturando indicadores socioeconómicos como edad y nivel de estudio del productor, miembros de la familia, mano de obra familiar, demografía y manejo de la granja, tamaño y composición del hato y aspectos relacionados con la producción de leche.

### **Análisis de datos**

Con la información obtenida se estructuró una base de datos en Excel versión 2007 (Microsoft), para determinar promedios, desviación estándar y porcentajes.

### **V.1.3 RESULTADOS**

Se estudiaron 100 (52.6%) de los 190 sistemas de producción lechera a pequeña escala existentes en las localidades de Téjaro y Cotzio. En el 47.4% restante el productor no accedió a participar. Las 90 granjas de las que no se obtuvo información se debió a la negativa del productor a responder al cuestionario. El 67% de los entrevistados tiene una edad en el rango de 51 a 70 años (67%), el 12% está por encima de los 71 años de edad y el 21% restante por debajo de los 50 años de edad (Tabla 1), con una escolaridad promedio de 4.8 años, predominando los varones (99%). Solo el 55% de los productores se dedica exclusivamente a las labores de la granja, ya que el 45% restante tiene fuentes adicionales de ingresos económicos; 5% tienen empleo formal (chofer de camiones urbanos, herreros), 20% cuentan con tiendas de abarrotes y el 20% restante se dedica al empleo informal

(trabajos temporales) (Tabla 1). En cuanto a la mano de obra, solo el 14% de los productores contratan trabajadores que ayudan con las tareas de la granja (ordeña, limpieza y alimentación del ganado), ya que en el 86% de los casos ayudan miembros de la familia, principalmente los hijos/hijas y conyuges (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características socioeconómicas de los productores e infraestructura de las granjas en las localidades de Téjaro y Cotzío.

Variables	Clasificación	Porcentaje (%) <sup>a</sup>
Edad del encargado (años)	≤ 50 años	21
	51-70	67
	≥ 71 años	12
Ocupación	Granja únicamente	55
	Granja + empleo formal	5
	Granja + negocio	20
	Otros	20
Miembros de la familia que participan en la granja (aparte del productor)	Esposa (o)	8
	Hijo	71
	Hija	7
	Empleados	14
Educación	Sin estudios	23
	Primaria	45
	Secundaria	30
	Preparatoria	2

<sup>a</sup> n=100 productores.

La mayoría de estas granjas (87%) se encuentran adyacentes a la vivienda del productor (Fig. 1) y únicamente el 13% restante se encuentra a no más de 700 m de la vivienda (Tabla 2). La infraestructura de las granjas es básica, con techos (cobertizos) de lámina de aluminio (61%) (Fig. 2a), teja de barro (17%) (Fig. 2b) e incluso de cartón (1%), aunque en algunos casos no poseen techo (21%) (Fig. 2c) (Tabla 2).





**Figura 1. Complejos vivienda-granja de las comunidades de estudio.** Ejemplos que muestran como la casa del productor se encuentra adyacente a la granja lechera. a) se presenta la vivienda al costado izquierdo de la granja al costado derecho; b) la vivienda aparece al fondo y la granja al frente.

**Tabla 2.** Infraestructura, composición del hato y alimentación de los sistemas de producción lechera a pequeña escala de Téjaro y Cotzío.

Variable		Porcentaje (%) <sup>a</sup>
Localización de la granja	Adyacente a la casa	87
	No adyacente a la casa	13
Material del techo o cobertizo	Lámina	61
	Teja	17
	Cartón	1
	Sin cobertizo	21
Presencia de piso (firme)	En toda la granja	11
	Solo en comederos	1
	Solo en sala de ordeño	38
	En comederos y sala de ordeño	38
	Sin piso firme	12
Disponibilidad de agua potable	En pila	95
	En bebederos	5

<sup>a</sup> n=100 productores.



a



b



c

**Figura 2. Cobertizos de las granjas en las comunidades de estudio.** Se muestran ejemplos de cobertizo de lámina en el área de camas de las vacas (a), de cobertizo de teja de barro en una pequeña área de la granja (b) y una granja sin cobertizo.

En cuanto a la presencia de piso de concreto (firme), el 11% cuenta con piso en toda la granja (Fig. 3a), el 38% cuenta con piso tanto en comederos como en sala de ordeño, 38% solo en la sala de ordeño (Fig. 3b), 1% solo en los comederos, y el 12% no cuenta con piso en ninguna área de la granja (Fig. 3c) (Tabla 2). Los corrales son austeros, construidos con cercas de alambre de púas en la mayoría de los casos (55%), llegando a existir corrales con cercos de piedras sobrepuestas sin cimentación (25%) y solo un bajo porcentaje cuenta con cercas tubulares (20%).



a



b



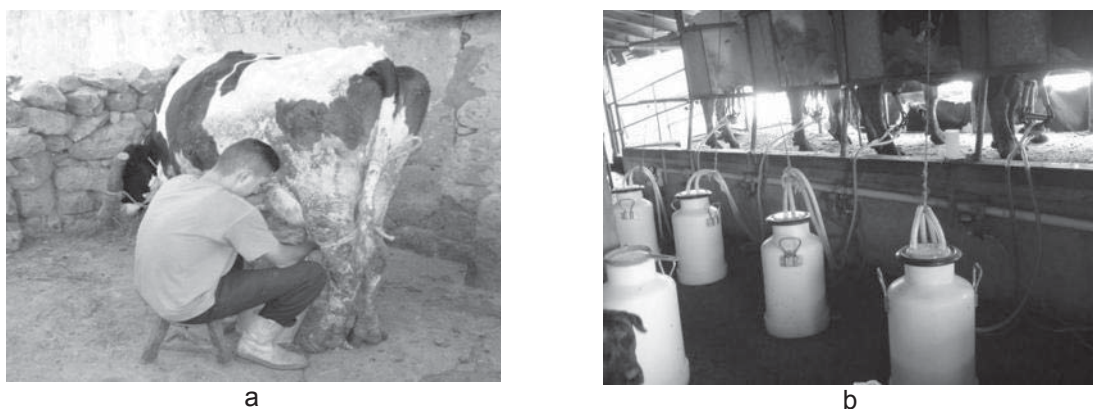
c

**Figura 3. Pisos de las granjas en las comunidades de estudio.** Se muestran ejemplos de granjas con piso firme en toda el área (a), con piso firme solo en el área de ordeño (b) y con piso de tierra (c).

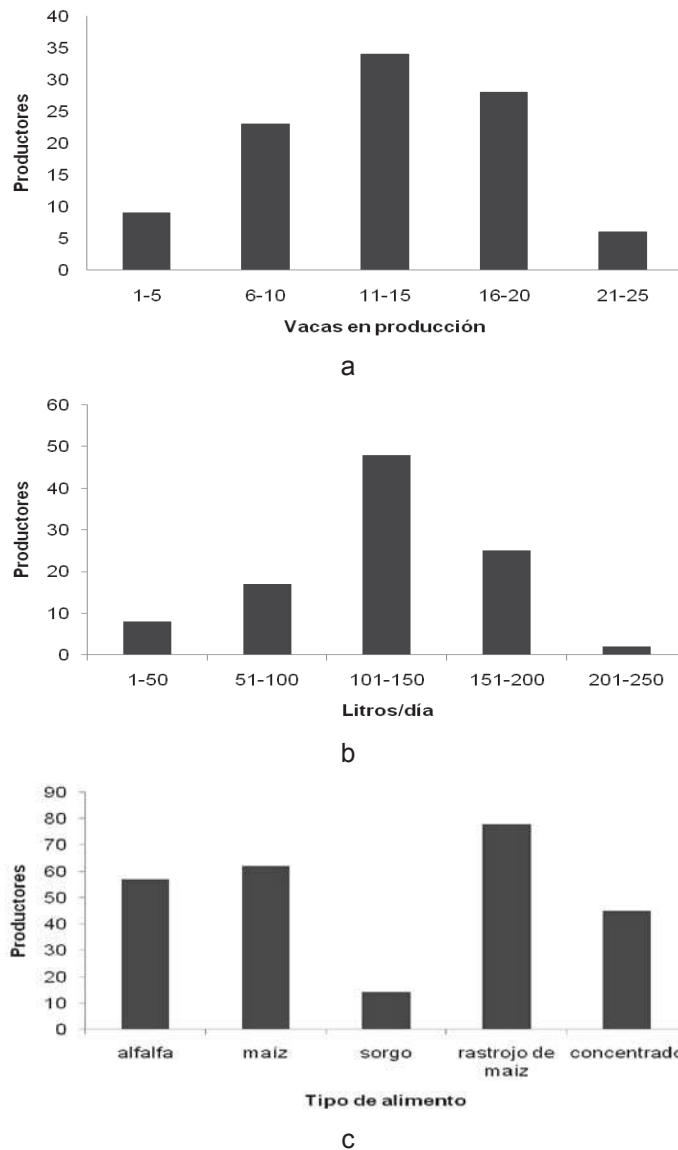
En relación a las características de producción, se encontró un promedio de 14.2 ( $\pm$  6.4) de cabezas por hato (solo ganado adulto), variando desde un animal hasta 41, siendo en su mayoría de raza Holstein con un promedio de 13.14 ( $\pm$  5.0) de hembras en producción (Fig. 5a). En las granjas predomina la ordeña manual (57%) y solo el 43% realiza la ordeña con ordeñadoras mecánicas de cuatro líneas (Fig. 4), obteniendo en promedio 18.6 litros/vaca/día en dos ordeñas al día. La producción de

leche al día por granja fue de 127.19 L en promedio, con un mínimo de 10 L y un máximo de 250 L (Fig. 5b). La alimentación del ganado es a base de una mezcla de esquilmos agrícolas que incluyen rastrojo y grano de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*) y alfalfa (*Medicago sativa*) (Fig. 5c), obtenidos de sus propias parcelas o de parcelas de productores de las mismas localidades; ocasionalmente se usa alimento concentrado.

En relación a los aspectos de comercialización y ganancia económica generada, se encontró que la leche obtenida se comercializa de manera directa al consumidor, o por medio de acopiadores-distribuidores denominados “boteros”, sin realizar un proceso de enfriamiento o refrigeración, lo que en términos coloquiales locales significa que se vende como leche “bronca” o “caliente”. Esto implica que la leche tiene que ser vendida el mismo día de ordeña. El precio pagado por litro es variable, oscilando desde los 2.50 (aprox. 0.23 US dólares en el año y mes de este estudio) hasta los 3.80 pesos mexicanos (aprox. 0.36 US dólares), dependiendo del “botero”. Este precio de venta implica que el ingreso mensual por la venta de leche puede oscilar entre los 750 (71.90 US dólares) hasta los 28,500 pesos (2,732.50 US dólares), dependiendo del nivel productivo/granja/día.



**Figura 4. Tipos de ordeña en las granjas de las comunidades de estudio.** a) ordeña manual y b) ordeña mecánica de cuatro líneas.

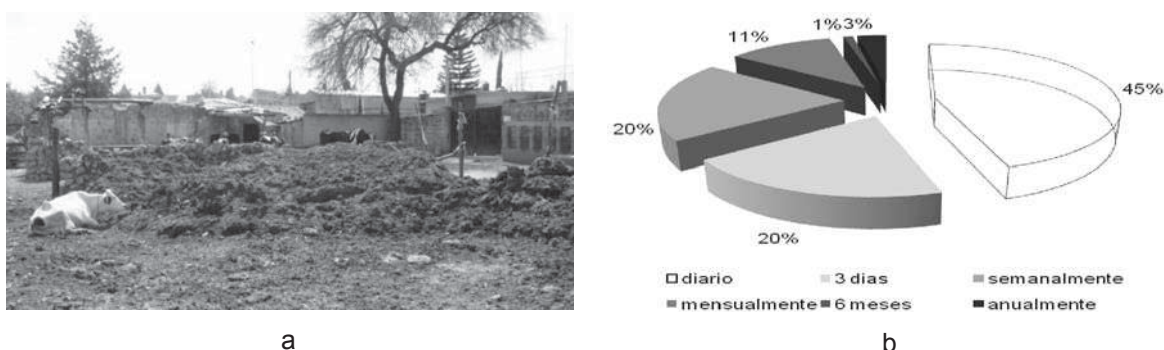


**Figura 5. Características de producción de las granjas de estudio.** a) número de vacas en producción por granja, b) cantidad de litros de leche/día por productor y c) tipo de alimento usado por los productores para alimentar el ganado.

Un dato interesante en términos sanitarios lo constituye la limpieza de las ubres antes de la ordeña y el manejo de las excretas. Estos dos aspectos se encuentran relacionados mediante un tercero que es de infraestructura, ya que en todas las granjas de estudio, el material de cama sobre el que descansan las vacas está constituido por una mezcla de excretas con tierra, rastrojo de maíz y viruta de madera, estando este en contacto con las ubres (Fig. 6a; Fig. 7). La limpieza antes de la ordeña es un proceso que consiste exclusivamente en pasar una franela

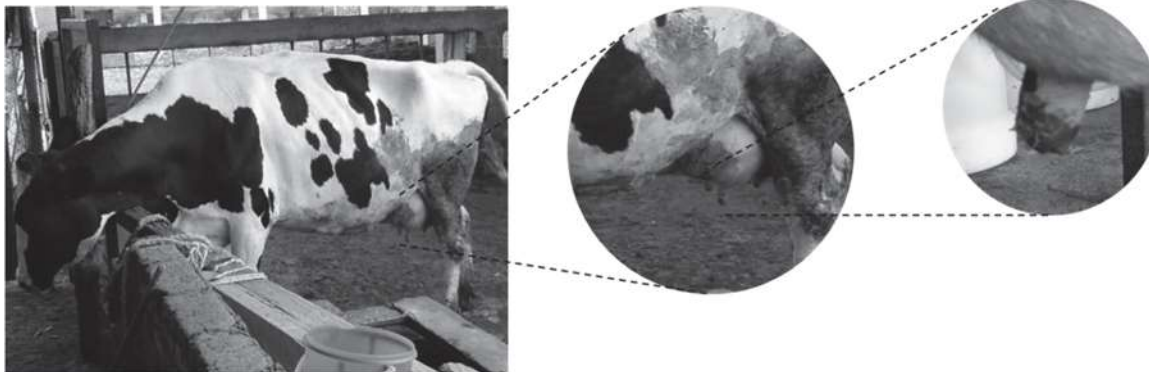


humedecida con agua por la ubre, usando la misma franela en todas las vacas. Esta combinación de excretas en el material de cama y la incipiente limpieza de las ubres incrementa la probabilidad de contaminación de la leche con bacterias provenientes de excretas. Las excretas generadas por el ganado, son utilizadas como abono en las parcelas de los productores en donde se cultiva el alimento del ganado, para lo cual son retiradas de la granja mediante carretas tiradas por caballos con una periodicidad que varía entre cada productor, favoreciendo en algunos casos su acumulación (Fig. 6a). Algunas granjas (45%) remueven las excretas diariamente, mientras que otras lo hacen cada tres días (20%), semanalmente (20%), mensualmente (11%), semestralmente (1%) o hasta anualmente (3%) (Fig 6b).



**Figura 6. Acumulación de excretas del ganado en las granjas de estudio.** a) granja en la cual se retiran las excretas mensualmente, el tamaño del cúmulo de excretas puede compararse con la vaca echada y b) gráfico que muestra la frecuencia con la que los productores retiran las excretas de las granjas (n=100).

Información adicional muestra que el 87% de los productores cuentan con otras especies de animales de granja, aparte del ganado vacuno. Estos se utilizan ya sea para ayudar en las tareas de la granja como el caso de equinos, como animales de engorda para su comercialización posterior o como fuente de alimento, como en el caso de las aves de corral, caprinos y porcinos.



**Figura 7. Condiciones de las ubres antes del ordeño.** Al estar las vacas echadas en el piso o material de cama se llenan con excretas.

#### **V.1.4 DISCUSIÓN**

En este estudio se describen los sistemas de producción lechera a pequeña escala existentes en el altiplano del estado de Michoacán, en la región centro occidente de México. Los resultados obtenidos muestran que algunas de las características socioeconómicas de los sistemas a pequeña escala aquí estudiados difieren en algunos indicadores reportados en otras regiones del país e incluso de esta misma región.

En los estados de Veracruz y Guanajuato la edad promedio del propietario encargado de la producción o jefe de familia es de 45 años (Espinosa *et al.*, 2004) mientras que en el estado de Tlaxcala es de 46.6 años (Cesín *et al.*, 2007). Dentro del estado de Michoacán, Villa-Méndez *et al.* (2008) reportan una edad promedio de 45 años para la región de Tierra Caliente, mientras que Colunga *et al.* (2009) reportan para la misma zona aquí estudiada, una edad promedio de 47 años, diferente a la obtenida en este estudio (59.2 años), edad promedio máxima reportada para los sistemas de producción a pequeña escala en México. Esta discrepancia puede deberse a dos factores. Por un lado, en el estudio de Colunga *et al.* solo analizaron 9 (4.7%) sistemas de producción, por lo que la observación del 52.6% de los sistemas existentes en el presente trabajo ofrece una descripción más completa. Por otro lado, al igual que en el estado de Puebla (Cervantes *et al.*, 2007), en los últimos años se ha registrado un abandono de los sistemas de producción debido al futuro poco favorable de estos sistemas, cambiando de actividad productiva

o incluso migrando hacia otros estados o a Estados Unidos en busca de mejores oportunidades de vida. Este fenómeno migratorio se da principalmente en jóvenes en edad productiva, por ello los productores son principalmente adultos e incluso personas de la tercera edad. Esto sugiere que la producción lechera a pequeña escala en la región de estudio, está dejando de representar un factor de desarrollo rural y una opción laboral para la población joven.

Un dato socioeconómico relacionado con la edad es el nivel de escolaridad de los productores. El promedio obtenido de 4.8 años muestra que no concluyeron el nivel básico de educación en México. Este resultado es similar al del estudio de Colunga et al. (2009) que reporta 5 años de escolaridad. En el estado de Tlaxcala se reporta una escolaridad de 8 años (Cesín *et al.*, 2007). Esta información sugiere que la producción lechera a pequeña escala constituye una opción socioeconómica para gente con bajos niveles de escolaridad en el área rural, a la cual le resulta más difícil encontrar opciones laborales en otras áreas.

En relación a los ingresos económicos que obtiene el productor por su exclusividad laboral en la producción lechera (55%), los datos obtenidos contrastan con lo reportado en el estado de México, donde de 69 productores, solo el 20.2% presentaron ingresos exclusivamente de la producción de leche, mientras que el resto lo obtiene de combinar esta con otras actividades (Espinoza-Ortega *et al.*, 2007). Esta diferencia puede deberse a que en ese estado existe un gran abandono o reconversión de actividades productivas debido a la baja comercialización de la leche (Cervantes *et al.*, 2007).

El porcentaje de sistemas productores contiguos a la vivienda del productor (87%), contrasta con los datos de Méndez y Cazarín et al. (2000) para la misma zona de estudio, quienes reportaron tan solo el 56%. Lo más probable es que la diferencia esté asociada al bajo número de granjas analizadas, ya que solo se documentaron las características de 9 sistemas productivos en el trabajo previamente citado, lo que da mayor confiabilidad a nuestros datos. El ganado se mantiene en condiciones de estabulación (confinamiento) permanente en instalaciones rústicas, con infraestructura básica y muy cercanas o adyacentes a la vivienda del productor; por lo que éstos sistemas presentan características propias de los sistemas de



producción lechera denominados “granjas de traspatio” (Castro *et al.*, 2001), al igual que en los sistemas de producción descritos para el estado de Jalisco (García-Muñiz *et al.*, 2007). La cercanía entre el área de producción y la vivienda puede tener ventajas obvias en el manejo, como el ahorro en gastos de transporte y una administración óptima del tiempo de trabajo y de descanso, o bien la combinación con otras actividades productivas. No obstante, puede tener desventajas, como un posible incremento en los riesgos de zoonosis o de contaminación de la leche con bacterias de origen humano. Estos aspectos deben ser estudiados con mayor profundidad a futuro.

El número de animales por hato y la producción diaria de las granjas aquí estudiadas contrasta con los sistemas de producción a pequeña escala evaluados en otros estados de México. En el estado de Tlaxcala se ha reportado un promedio de 5.9 cabezas por hato, de las cuales 3.9 son vacas en producción que generan 7.3 litros/vaca/día (Cesín *et al.*, 2007). También por debajo de las estadísticas de nuestro estudio se encuentran los sistemas de producción del estado de Guanajuato, donde cuentan con 9.3 animales en el hato de los cuales 7 son vacas con producción promedio de 9 litros/vaca/día (Espinosa *et al.*, 2004). Una de las causas principales de la diferencia en los promedios de producción entre granjas, es sin duda la diferencia en el número de vacas con que cuenta cada hato, ya que en la mayoría de los estudios se reportan hatos conformados por ganado lechero de raza Holstein, lo que descarta el componente genético en las variaciones de producción. En contraste, en el estado de Jalisco las granjas tienen 35 cabezas, de las cuales 27 son vacas en producción y una producción promedio de 19 litros/vaca/día (García-Muñiz *et al.*, 2007). Aunque en el caso del estado de Jalisco las granjas cuentan con un número mayor de vacas, el nivel de producción es similar al encontrado en esta investigación, lo que puede explicarse por la presencia de ganado Criollo en las granjas de dicho estado, el cual gracias a su rusticidad se adapta a las condiciones de manejo de este tipo de sistemas productores, pero no logra igualar la producción de leche del ganado de raza Holstein.

Sin duda, la diferencia en la calidad y disponibilidad de alimento puede ser una causa importante de la diferencia en los niveles de producción entre las granjas de

producción a pequeña escala en México, como es el caso de Jalisco, donde a pesar de contar con un mayor número de animales, presenta una producción promedio similar al encontrado en la zona de estudio. La alimentación del ganado en los sistemas productivos estudiados es a base de esquilmos agrícolas, una característica distintiva de los sistemas de producción a pequeña escala en México, tanto en el sistema estabulado como en el de pastoreo (Aguilar y López, 2006; Cesín *et al.*, 2007; García-Muñiz *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2008). Arriaga-Jordan *et al.* (2002) compararon los rendimientos de leche generados por tres tipos de alimentación en el mismo tipo de ganado en granjas de producción a pequeña escala del estado de México, en condiciones climáticas y de manejo semejantes a nuestra área de estudio. En dicho trabajo se encontró que con una dieta tradicional a base de esquilmo de maíz complementada con silo de maíz y 3.3 kg/vaca/día de concentrado, se obtenía mejor producción de leche (15.5 litros/vaca/día) aumentando hasta en tres litros la producción. Así, el uso de bloques de concentrado proteico ayudarían a mejorar la producción de leche en las granjas analizadas en el presente trabajo; sin embargo, habría que considerar si los productores están dispuestos a invertir en la compra de los bloques, ya que esto representaría una inversión extra en general, y en algunos casos una pérdida económica. Los pocos productores que agregan concentrado en la dieta del ganado lo hacen de manera deficiente, utilizando aproximadamente 2 kg/vaca/semanalmente. Por otro lado, se ha realizado un análisis de modelado para estimar cuál sería el tipo de alimentación más conveniente para optimizar la relación costo-beneficio de la producción de leche en las granjas de estudio (Val-Arreola *et al.*, 2004), encontrándose que una alimentación que incluya silo y grano de maíz, alfalfa, pasto y heno de avena, es superior a la alimentación tradicional basada en alfalfa y rastrojo de maíz, en términos de nutrientes y producción.

El intermediario (botero), fija los precios de la leche ajustándolos a la estacionalidad de la demanda, así como a las variaciones estacionales de la producción. El precio promedio de venta al intermediario encontrado en este estudio ( $3.4 \pm 0.47$  pesos o  $0.31 \pm 0.04$  US dólares/litro) coincide con el reporte previo de Colunga *et al.* (2009) de 3.50 pesos (0.32 US dólares) y con el de García *et al.*

(2007) de 3.12 pesos (0.28 US dólares) por litro. El precio de venta al consumidor en el estado de Michoacán es de 7 pesos (0.64 US dólares), lo que muestra que el intermediario puede llegar a ganar un 100% del precio al cual lo adquirió. Un beneficio tangible para este tipo de sistemas sería la posibilidad de comercializar directamente su producto, lo que permitiría aumentar de manera considerable su margen de ganancia y de operación. Son necesarios estudios que analicen la posibilidad de comercialización directa de los productores de las granjas de Téjaro y Cotzio, los factores limitantes y los beneficios derivados de esto.

Las excretas de ganado son utilizadas en todos los sistemas de producción estudiados como abono en las parcelas, donde son acumuladas desde un día hasta un año, hasta su incorporación a la tierra de cultivo una vez que están secas. Al acumular las excretas se facilita la propagación de fauna nociva tal como la gallina ciega (*Phyllophaga sp.*) y los roedores. Por otro lado, la acumulación de excretas por tiempo prolongado se puede convertir en fuente de agentes de enfermedades como tuberculosis intestinal, paratuberculosis, brucelosis, leptospirosis, ántrax y parásitos gastrointestinales, entre otros (Méndez y Cazarín *et al.*, 2000). Es necesario llevar a cabo estudios más detallados sobre los aspectos sanitarios y de manejo de excretas en granjas de producción a pequeña escala en México, debido a que no existe información al respecto a pesar de su relevancia en la salud pública.

A pesar de las diferencias aquí señaladas del sistema de producción a pequeña escala del municipio de Tarímbaro en el estado de Michoacán con otras regiones del país, este comparte algunas características con sistemas productivos de esta naturaleza en otras regiones de México, relacionadas principalmente con la infraestructura precaria. Estos sistemas se fortalecen al usar mano de obra familiar y producir sus propio forrajes, ya que no existen gastos en ese sentido. No obstante, el bajo número de cabezas productivas en el hato y la dificultad para adoptar innovaciones tecnológicas redundan en una baja producción, lo que aunado a los bajos precios de venta al intermediario, ocasionan ganancias escasas al núcleo familiar. Esto hace necesaria la búsqueda de actividades económicas adicionales a la producción de leche. Sin embargo, dado el bajo nivel de escolaridad y la edad de los productores, las opciones son restringidas. Adicionalmente, las prácticas de

manejo de excretas pueden ocasionar una baja calidad bacteriológica de la leche e incrementa el riesgo en salud por contaminación con microorganismos patógenos, algunos de ellos potencialmente zoonóticos. Todo lo anterior, pone al sistema de producción a pequeña escala en peligro de desaparecer; esto es preocupante ya que en más del 50% de los casos, esta actividad es el sustento familiar del área rural estudiada.

#### V.1.5 REFERENCIAS

- Aguilar V. A. y López L. M. 2006. **Como lograr que la ganadería lechera mexicana sea competitiva a nivel internacional.** *Revista Mexicana de Agronegocios* 18:1-15.
- Álvarez H. H. 2002. **Aspectos epidemiológicos de la tuberculosis bovina en sistemas de producción familiar,** (tesis no publicada, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo)
- Arriaga-Jordán C. M., and Pearson R. A. 2004. **The contribution of livestock to smallholder livelihoods: the situation in Mexico.** In: E. Owen, T. Smith, M. A. Steele, S. Anderson, A. J. Duncan, M. Herrero, J. D. Leaver, C. K. Reynolds, J. I. Richards and J. K. Vera (eds), *Responding to the Livestock Revolution – the Role of Globalisation and Implications for Poverty Alleviation.* Nottingham: Nottingham University Press, 99–115.
- Arriaga-Jordán C. M., Albarrán-Portillo B., Espinoza-Ortega A., García-Martínez A., and Castelán-Ortega O. A. 2002. **On-farm comparison of feeding strategies based on forages for small-scale dairy production systems in the Highlands of Central Mexico.** *Experimental Agriculture* 38:375-388.
- Castro L. C. J., Sánchez R. G., Iruegas E. L. F. y Saucedo L. G. 2001. **Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México.** FIRA boletín informativo, vol. XXXIII num. 317:107-118.
- Cervantes E. F., Cesín V. A. y Pérez S. S. L. 2007. **El abandono de la ganadería lechera y reconversión productiva en Chipilo, Puebla.** *Técnica Pecuaria en México* 45:195-208.

- Cesín V. A., Aliphat F. M., Ramírez V. B., Herrera H. J. G. y Martínez C. D. 2007. **Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México.** *Técnica Pecuaria en México* 45:61-76.
- Colunga G. B., Villa-Méndez C. I., Tzintzun-Rascón R., Tena-Martínez M. J. y Val-Arreola D. 2009. **La caracterización socioeconómica de los sistemas campesinos de producción en pequeña escala de la cuenca lechera Morelia-Alvaro Obregón, Michoacán.** *Livestock Research for Rural Development* <http://www.lrrd.org/lrrd21/10/colu21159.htm> (29 de noviembre del 2010)
- Duarte R. C. M. y Avila C. E. 1997. **Prevalencia de brucelosis mediante la prueba de anillo en leche en hatos lecheros de Tájaro y Cotzío, Michoacán,** (tesis no publicada, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo)
- Espinosa G. J. A., Wiggins S., Gonzalez O. A. T. y Aguilar B. U. 2004. **Sustentabilidad económica a nivel de empresa. Aplicación a unidades familiares de producción de leche en México.** *Técnica Pecuaria en México* 42:55-70.
- Espinoza-Ortega A., Espinosa-Ayala E., Bastida-López J., Castañeda-Martínez T., and Arriaga-Jordán C. M. 2007. **Small-scale dairy farming in the highlands of central Mexico: technical, economic and social aspects and their impact on poverty.** *Experimental Agriculture* 43:241-256.
- García H. L. A., Alvarez M. A., Martinez B. E. y Del Valle R. M. C. 1999. **La globalización del sistema alimentario y el comportamiento del mercado mundial y regional de productos lácteos. Dinámica del sistema lechero mexicano en el marco regional y global.** México (DF) México: Instituto de Investigaciones Sociales-UNAM, Instituto de Investigaciones Económicas-UNAM, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco y Plaza y Valdés.

- García-Muñiz J. G., Mariscal-Aguayo D. V., Caldera-Navarrete N. A., Ramírez-Valverde R., Estrella-Quintero H. y Núñez-Domínguez R. 2007. **Variables relacionadas con la producción de leche de ganado Holstein en agroempresas familiares con diferente nivel tecnológico.** *Interciencia* 32:841-846.
- Méndez y Cazarín M. D., Tzintzun R. R. y Val A. D. 2000. **Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala.** *Livestock Research for Rural Development* 12:2000.
- Muñoz R. M., Cervantes E. F. y García M. J. G. 1999. **El TLCAN y la situación actual de la producción láctea en México.** Procede de las memorias "TLCAN y Agricultura". Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM)
- Nordlund K. V., Goodger W. J., Bennett T. B., Shamsuddin M., and Klos R. F. 2007. **Methods for conducting an economic opportunity survey in smallholder dairy farms.** *Tropical Animal Health and Production* 39:557-566.
- Sánchez G. L. G., Solorio R. J. L. y Santos F. J. 2008. **Factores limitativos al desarrollo del sistema familiar de producción de leche, en Michoacán, México.** *Cuadernos de Desarrollo Rural* 5:133-146.
- Val-Arreola D., Kebreab E., Mills J. A. N., Wiggins S. L., and France J. 2004. **Forage production and nutrient availability in small-scale dairy systems in central Mexico using linear programming and partial budgeting.** *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 69:191-201.
- Villa-Méndez C.I., Tena M. J., Tzintzun R. y Val D. 2008. **Caracterización de los sistemas ganaderos en dos comunidades del municipio de Tuzantla de la región de Tierra Caliente, Michoacán.** *Avances en Investigación Agropecuaria* 12:45-57.

## V.2 CAPÍTULO II

### ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE LA COMUNIDAD DE ENTEROBACTERIAS CULTIVABLES EN GRANJAS DE PRODUCCIÓN LECHERA A PEQUEÑA ESCALA EN MÉXICO: UNA APROXIMACIÓN ECOLÓGICA EN CUESTIONES DE SALUD PÚBLICA

#### Resumen

Las granjas lecheras constituyen un reservorio para una gran diversidad de bacterias patógenas, las cuales pueden diseminarse al entorno ocasionando problemas de salud pública. La identificación y dispersión de bacterias patógenas presentes en granjas lecheras ha sido abordada empleando herramientas de epidemiología molecular microbiana. Este es el caso de especies de enterobacterias zoonóticas en general y patotipos de *E. coli* en particular. No obstante, la epidemiología molecular microbiana de granjas lecheras no ha incorporado herramientas para el análisis de comunidades bacterianas que le permitan analizar, varias especies de manera simultánea. Se identificaron mediante la combinación de técnicas de genética molecular y microbiología clásica las especies de enterobacterias cultivables más abundantes de 8 granjas de producción lechera a pequeña escala de las localidades de Tájaro y Cotzio pertenecientes al municipio de Tarímbaro, Mich. Se obtuvieron 310 aislados provenientes de muestras de leche (n=71), ubre (n=79), material de cama (n=85) y excretas (n=75). Los aislados obtenidos se identificaron mediante la secuencia parcial del gen de la subunidad 16S de ARN ribosomal como *Escherichia coli* (n=196), *Escherichia fergusonii* (n=2), *Shigella flexneri* (n=40), *Enterobacter cloacae* (n=6), *Enterobacter hormaechei* (n=3), *Enterobacter cowanii* (n=2), *Klebsiella oxytoca* (n=5), *Brenneria rubrifaciens* (n=53) y *Photorhabdus luminescens* (n=3). Se discute el riesgo potencial para la salud del ganado y del ser humano de cada una de las especies identificadas. Empleando los paquetes DOTUR y UniFrac las 310 secuencias se agruparon en 60 OTUs, con un mínimo de 2 y un máximo de 19 por granja, y se encontraron grupos de granjas que comparten la estructura de la comunidad, presentándose diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de granjas. Estos resultados

sugieren que las prácticas de manejo de las granjas estudiadas influyen en la estructura de las comunidades bacterianas, aunque no se descarta la influencia de otros factores como el microambiente.



## V.2.1 INTRODUCCIÓN

El papel de las granjas lecheras como reservorios de bacterias patógenas se encuentra documentado ampliamente (Nam *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2005). Diversos estudios han reportado el aislamiento de patógenos bacterianos en distintos ambientes o muestras dentro de la granja como el suelo (Young *et al.*, 2005), las excretas (Fukushima y Seki, 2004), el alimento (Davis *et al.*, 2003), los filtros de ordeña (Hassan *et al.*, 2000; Warnick *et al.*, 2003; Van Kessel *et al.*, 2008) y el tanque de almacenamiento (Jayarao y Henning, 2001; Warnick *et al.*, 2003; Jayarao *et al.*, 2006; D'Amico *et al.*, 2008; Van Kessel *et al.*, 2008). La diversidad de bacterias patógenas dentro del ambiente de la granja incluye especies tanto Gram positivas (Oliver *et al.*, 2005) como Gram negativas (Watts, 1988; Martins *et al.*, 2006), destacando dentro de estas últimas los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (Srinivasan *et al.*, 2008). Los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella* y *Salmonella*, entre otros dentro de esta familia incluyen algunas de las principales especies de importancia en salud pública debido a su capacidad para causar enfermedades tanto en el ganado como en el ser humano (Crump *et al.*, 2002; Gyles, 2007; Munoz *et al.*, 2008; Pradhan *et al.*, 2009). Algunas especies dentro de estos géneros, se encuentran entre los principales agentes causantes de mastitis bovina ambiental, enfermedad infecciosa que afecta al ganado lechero en varias partes del mundo y en la que se invierten considerables sumas de dinero para su control y cura (Kikuchi *et al.*, 1995; Fetrow *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2007; Paulin-Curlee *et al.*, 2007). Cuando las prácticas de producción no son adecuadas, las bacterias en el ambiente de la granja contaminan la leche (Phillips y Griffiths, 1990; Oliver *et al.*, 2005; Coorevits *et al.*, 2008; LeJeune y Rajala-Schultz, 2009), incrementando el riesgo de ocasionar brotes de enfermedades gastrointestinales, particularmente cuando se preparan productos como queso o se consume la leche sin pasteurizar (leche cruda) (Allos, 2001; Granum, 2001; Little *et al.*, 2008). Algunas especies dentro de estos géneros son patógenos de humanos que no causan síntomas en su paso por el tracto digestivo del ganado, como el caso de *E. coli* O157:H7 (Armstrong *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.* 2001; Renter y Sargeant, 2002;). Por lo anterior, el monitoreo de bacterias patógenas en el ambiente de la granja y la

leche producida es importante para el diseño de estrategias de prevención de brotes de enfermedades en el ganado y en el consumidor.

Las herramientas de la epidemiología molecular microbiana aplicadas al estudio de bacterias patógenas en el ambiente de las granjas lecheras permiten la detección y monitoreo en el ambiente de la granja de una especie o tipo particular (Eriksson *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2006; Munoz *et al.*, 2008), empleando diversas herramientas para el análisis de ADN. Así, dichos trabajos se enfocan en primera instancia en los dos objetivos básicos de la epidemiología molecular microbiana, la identificación (asignación de especie, subespecie, serotipo, clona, etc.) y la tipificación (diversidad, factores de patogenicidad, etc.) de la población de un patógeno en particular (Tibayrenc, 2005). Aunque existen trabajos en los cuales se evalúa la presencia simultánea de más de un patógeno (Davis *et al.*, 2003; Doyle y Erickson, 2006), dichos reportes restringen el análisis de diversidad a nivel de población (Urdahl *et al.*, 2008), sin emplear herramientas para el análisis de la comunidad.

Las técnicas de detección y análisis derivadas del análisis genético-molecular han permitido el análisis de comunidades bacterianas en distintos ambientes o tipos de muestra (Keller y Zengler, 2004; Tringe y Hugenholtz, 2008) y han sido aplicadas en leche y derivados lácteos (Giraffa y Rossetti, 2004; Delbès *et al.*, 2007; Raats *et al.*, 2011), pero el análisis desde la perspectiva de comunidad bacteriana en el ambiente de las granjas lecheras solo ha sido abordado recientemente, y los estudios al respecto son aún escasos (Durso *et al.*, 2011). Los estudios de ecología molecular microbiana emplean técnicas independientes del cultivo, analizando librerías de clonas originadas generalmente a partir de la amplificación de gen de la subunidad 16S de RNAr empleando ADN genómico de una muestra (Suau *et al.*, 1999; Hold *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). En contraste, el aislamiento y la caracterización de cepas del ambiente de la granja lechera es deseable, ya que permite la evaluación de características fisiológicas de los aislados que son importantes desde el punto de vista epidemiológico y de la salud pública, como la resistencia a antibióticos (Acar y Moulin, 2006; Sawant *et al.*, 2007; Ahmed y Shimamoto 2011), la detección de factores de virulencia (Scott *et al.*, 2006; Morandi

*et al.*, 2007), o el análisis de la diversidad genética de un patógeno en particular (Liebana *et al.*, 2003; Capurro *et al.*, 2010; Bednarski *et al.*, 2011). Adicionalmente, diversos trabajos han combinado las técnicas microbiológicas tradicionales de cultivo y aislamiento con herramientas de tipificación genético- molecular para el análisis de la comunidad bacteriana en distintos tipos de ambientes (Heylen *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2009; Eichorst *et al.*, 2011), incluyendo el aire y el polvo de granjas lecheras (Normand *et al.*, 2009). Estos trabajos muestran la utilidad de la combinación de técnicas tradicionales de cultivo con herramientas de tipificación molecular para el análisis de bacterias, generando información sobre su potencial biotecnológico, su papel ecológico, y su posible participación en procesos patológicos.

La mayor parte de los estudios sobre presencia de bacterias patógenas se han realizado en países desarrollados, en el ambiente de la granjas tecnificadas con hatos ganaderos grandes (ej. Jayarao y Henning, 2001; Pradhan *et al.*, 2009). No obstante, en los países en vías de desarrollo abundan los sistemas de producción a pequeña escala que trabajan con bajos niveles de tecnificación y hatos de pocos animales (Musalia *et al.*, 2007; Mekonnen *et al.*, 2010). Por otra parte, algunos de las especies o tipos patógenos de importancia en países desarrollados no tienen la misma relevancia en salud pública en países en vías de desarrollo (ver introducción del capítulo IV de este documento, en relación a los patotipos de *E. coli*).

Las diferencias en los sistemas de producción, en la ecología de los patógenos bacterianos y en las prioridades regionales de salud pública, hacen necesario realizar estudios para detectar y monitorear la presencia de bacterias patógenas en el ambiente de granjas de producción a pequeña escala y sus posibles implicaciones en salud pública, ya que los resultados y datos generados en granjas del primer mundo difícilmente serán extrapolables. En particular, en México no existen estudios sobre la presencia de bacterias patógenas en el ambiente de granjas de producción a pequeña escala, también denominado de traspatio o campesino. Por lo anterior, los objetivos del presente estudio fueron identificar las especies cultivables más comunes de enterobacterias patógenas potencialmente zoonóticas en el ambiente y la leche de granjas de producción lechera a pequeña escala del centro de México y comparar la estructura de la comunidad de

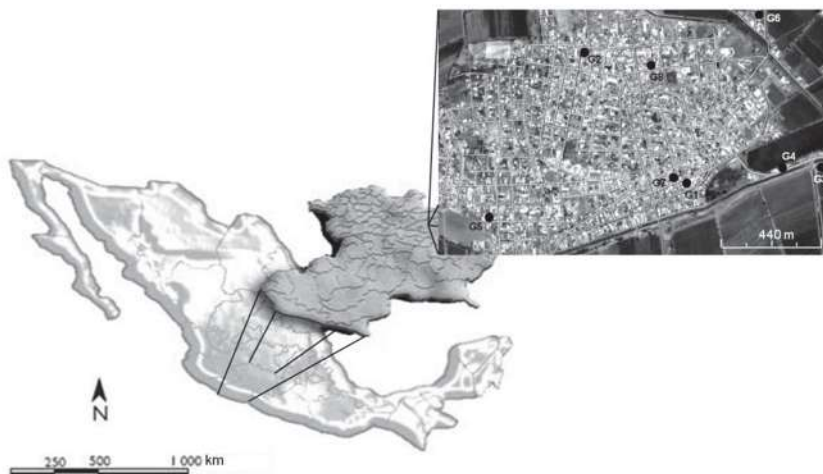
enterobacterias cultivables entre las granjas de estudio mediante el uso de herramientas de análisis comúnmente empleadas en ecología molecular microbiana.

## **V.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

La localización y características de las granjas de estudio, el método de muestreo empleado y la técnica de aislamiento de las cepas de estudio han sido previamente documentados (Rosales-Castillo *et al.*, en prensa, Capítulo III), y se presenta aquí solo información complementaria en dichos aspectos metodológicos.

### **Granjas de estudio**

En este trabajo se estudiaron seis granjas de producción lechera a pequeña escala cuyas características y localización fueron previamente descritas (Rosales-Castillo *et al.*, en prensa, Capítulo III), incluyéndose dos granjas adicionales con características de producción e higiene similares a las estudiadas con anterioridad. Las ocho granjas se encuentran en las comunidades rurales de Tájaro y Cotzio del municipio de Tarímbaro en el estado de Michoacán, ubicado en la región centro-este de México (Fig. 1). Las granjas presentan características tecnológicas semejantes, la ordeña es principalmente mecánica obteniéndose un promedio de 127.19 litros al día mediante 2 ordeñas diarias, la alimentación de ganado es a base de rastrojo y grano de maíz, sorgo y alfalfa. Las camas de las granjas están compuestas de una mezcla de rastrojo, viruta de madera y excretas secas; el manejo de las excretas incluye su remoción con distinta periodicidad de acuerdo a la granja, pudiendo ser diario o almacenarlas hasta por un año. La distancia mínima entre las granjas de estudio se presenta entre la granja G1 y la G7 con 45.5 m, y la distancia máxima entre las granjas G3 y G5 con 1,543.4 m.



**Figura 1. Localización de las granjas estudiadas.** La imagen a la derecha muestra una vista aérea de Tlaxcala y Cotzacoatlán con la ubicación de las granjas estudiadas (imagen de Google Earth).

### **Obtención de aislados bacterianos**

En un lapso de dos días se visitaron las ocho granjas de estudio para obtener muestras de leche, excretas, material de cama y ubre. Todas las muestras se colectaron en recipientes estériles, se colocaron a 4 °C para su transporte al laboratorio y se procesaron en las siguientes 24 h después de la colecta. Para el aislamiento de material de cama se tomaron 3 muestras de 5 g de cada granja, de las muestras previamente homogeneizadas se tomaron 5 g y se disgregaron en 20 ml de medio líquido Luria-Bertani (LB), de la re-suspensión obtenida se tomaron 50 µl para sembrar en medio sólido LB y agar McConkey. En el caso de las excretas de cada granja se tomaron de manera aleatoria 3 muestras de 5 g de excretas frescas y se disgregó 1 g en 10 ml de solución salina (0.9% NaCl), se realizaron diluciones seriales de la resuspensión y de la dilución 1:100 se tomaron 50 µl para inocular en medio sólido LB y agar McConkey. En el caso de las muestras de leche se tomaron muestras de 100 ml de los cuatro cuartos de tres vacas distintas y se utilizaron 50 µl de la muestra sin diluir para inocular placas con medio LB sólido y agar McConkey. Para el aislamiento de cepas adheridas a la parte externa de la ubre se muestrearon tres vacas por hato pasando un hisopo estéril por el área del pezón de los cuatro cuartos y con el mismo hisopo se inocularon directamente placas con medio sólido Luria-Bertani y agar McConkey mediante estriado. Las placas inoculadas se

incubaron a 37 °C durante 24 h y colonias bien diferenciadas se transfirieron a placas de medio LB para obtener cada uno de los aislados de estudio. Además de los 164 aislados de *E. coli* previamente estudiados (Rosales-Castillo *et al.*, en prensa, Capítulo III) se obtuvieron adicionalmente 146 aislados, sumando un total de 310 los cuales provienen de material de cama (n=85), excretas (n=75), leche (n=71) y ubre (n=79) de ocho granjas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de aislados obtenidos por muestra y por granja de estudio.

Granja	Muestra				Total
	Leche	Ubre	Material de cama	Excretas	
G1	8	12	12	12	44
G2	8	9	10	9	36
G3	10	11	10	8	39
G4	11	10	10	11	42
G5	9	12	10	8	39
G6	6	9	10	9	34
G7	11	9	12	9	41
G8	8	7	11	9	35
Total	71	79	85	75	310

G1 a G8, granjas 1 a la 8.

### Tipificación genético molecular

De los 310 aislados se extrajo ADN genómico por el método de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). Para la identificación de los aislados obtenidos se realizaron ensayos de PCR con los iniciadores ECA75F (5'-GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC-3') y ECR619R (5'-AGCCCGGGGATTTACATCTGACTTA-3') dirigidos al gen de la subunidad 16S de rRNA de *E. coli* (Sabat *et al.*, 2000). Bajando la temperatura de alineamiento a 50 °C, es posible amplificar con dichos iniciadores el gen de la subunidad 16S de rRNA de distintas enterobacterias. Los productos de amplificación obtenidos se secuenciaron en un equipo Abi Prism Genetic Analyzer ABI310 (Applied Biosystems, USA) empleando el kit BigDye Terminator Ver. 3.1 (Applied Biosystems, USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las secuencias obtenidas (500 pb en promedio) fueron comparadas con las depositadas en el GenBank mediante el

algoritmo Blastn, asociándose a secuencias homólogas de distintas cepas de enterobacterias con una identidad superior al 98% y con un valor de E de 0.0.

### **Análisis estadístico**

El software DOTUR (Schloss y Handelsman, 2005; <http://schloss.micro.umass.edu/software>) fue utilizado para agrupar las secuencias del gen de la subunidad 16S de RNAr obtenidas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs), así como para el cálculo de los índices de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) (Magurran, 1996; Hughes *et al.* 2001) y de Simpson (Magurran, 1996), y del estimador de riqueza no paramétrico Chao1 (Chao, 1987). Las secuencias con  $\geq 97\%$  de identidad fueron agrupadas dentro el mismo OTU, de acuerdo al paquete DOTUR (Vandamme *et al.*, 1996; Schloss y Handelsman, 2004). Para determinar la diversidad  $\beta$  se usó el paquete UniFrac (Lozupone y Knight, 2005; Lozupone *et al.*, 2006) usando sus dos medidas filogenéticas: UniFrac no ponderado (unweighted, UniFrac-U), una medida cualitativa y UniFrac ponderado (UniFrac weighted, UniFrac-W), una medida cuantitativa; realizándose en ambos casos la prueba de significancia UniFrac, el agrupamiento de ambientes y el Análisis de Coordenadas Principales (el cual se abreviará en adelante como PCoA, por ser la abreviatura comúnmente empleada como acronimia del inglés *Principal Coordinates Analysis*). UniFrac-U calcula la fracción de la longitud total de la rama única a una muestra o ambiente a través de un árbol filogenético construido para cada par de muestras o ambientes. Mientras que en UniFrac-W la longitud de las ramas es pesada por la abundancia relativa de cada secuencia dentro de su comunidad. La prueba de significancia UniFrac se utiliza para determinar si dos comunidades microbianas son significativamente diferentes. Por otro lado, usando la matriz de distancias que produce UniFrac se construyó el agrupamiento de ambientes usando el algoritmo de agrupamiento jerárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) y el PCoA, el cual difiere del análisis de componentes principales en que los datos de entrada son distancias filogenéticas entre cada par de ambientes, en lugar del número de veces que cada secuencia es observada en



cada ambiente. Así, al igual que en la prueba UniFrac, se calculó un PCoA no ponderado (PCoA-U) y un PCoA ponderado (PCoA-W).

### V.2.3 RESULTADOS

En la tabla 2 se muestran los taxa, los números de acceso al GenBank y el porcentaje de similitud obtenidos de las secuencias con máxima similitud al realizar la búsqueda Blastn de las secuencias del gen de la subunidad 16S obtenidas en este trabajo. Además de las 164 secuencias del gen de la subunidad 16S de RNAr de *E. coli* obtenidas con anterioridad (Rosales-Castillo *et al.*, en prensa, Capítulo III), al realizar la búsqueda Blastn en el GenBank de las secuencias obtenidas a partir del resto de aislados, se obtuvieron otras 32 secuencias que fueron identificadas como *Escherichia coli*, 40 como *Shigella flexneri*, 5 como *Klebsiella oxytoca*, 2 como *Escherichia fergusonii* y 11 dentro del género *Enterobacter* (6 de *E. cloacae*, 3 *E. hormaechei* y 2 de *E. cowanii*). Los 56 aislados restantes fueron identificados como enterobacterias no asociadas a problemas de salud pública o salud animal, como el caso de *Brenneria rubrifaciens* y *Photobacterium luminescens*, enterobacterias patógenas de plantas y de insectos, respectivamente. Las cepas asociadas a *E. coli* y *B. rubrifaciens* mostraron una presencia ubicua, encontrándose en todas las granjas de estudio, mientras que *S. flexneri* fue localizada en 6 de las granjas. En contraste las cepas asociadas a *E. fergusonii* y *P. luminescens* solo fueron localizadas en una granja de las 8 estudiadas.

En cuanto a la presencia en distintos tipos de muestra de las especies bacterianas identificadas, tanto *Escherichia coli* como *Shigella flexneri* fueron encontradas en los cuatro tipos de muestras analizadas y *Klebsiella oxytoca* fue aislada de todas las muestras, a excepción de material de cama. Las bacterias del género *Enterobacter* fueron encontradas solo en ubres y material de cama, mientras que la especie fitopatógena *Brenneria rubrifaciens* fue encontrada en todos los tipos de muestra.



**Tabla 2.** Identificación de las especies de bacterias aisladas de las granjas de estudio<sup>a</sup>.

Especie	No. <sup>b</sup>	Número de acceso al Genbank <sup>c</sup>	Porcentaje de similitud (%)
<i>Escherichia coli</i>	196	HM803167-GU348986	95-100
<i>Escherichia fergusonii</i>	2	HQ214033	99-100
<i>Shigella flexneri</i>	40	HQ701686	96-100
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	HQ683951	99
<i>Enterobacter hormaechei</i>	3	HQ663905	99
<i>Enterobacter cowanii</i>	2	HQ683807	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	AJ871863	99
<i>Brenneria rubrifaciens</i>	53	EU490604	96-100
<i>Photobacterium luminescens</i>	3	DQ518589	97-99

<sup>a</sup> Se muestran los números de acceso al Genbank y el porcentaje de similitud de las secuencias 16S de ARNr de las especies que presentaron la máxima identidad con los aislados bacterianos obtenidos.

<sup>b</sup> Número de cepas que presentaron similitud con cada taxa del Genbank.

<sup>c</sup> Debido al número de cepas de *E. coli*, los resultados de la búsqueda Blastn variaron tanto para la secuencia (distinto número de acceso al GenBank) con máxima similitud como para el porcentaje de similitud, por lo que se muestran los datos correspondientes a la menor y mayor similitud encontrada considerando todos los aislados. En las secuencias del resto de aislados, no obstante variaciones en el valor de similitud, todas mostraron una máxima identidad con la misma secuencia (mismo número de acceso al GenBank) de la especie a la que fueron asignadas.

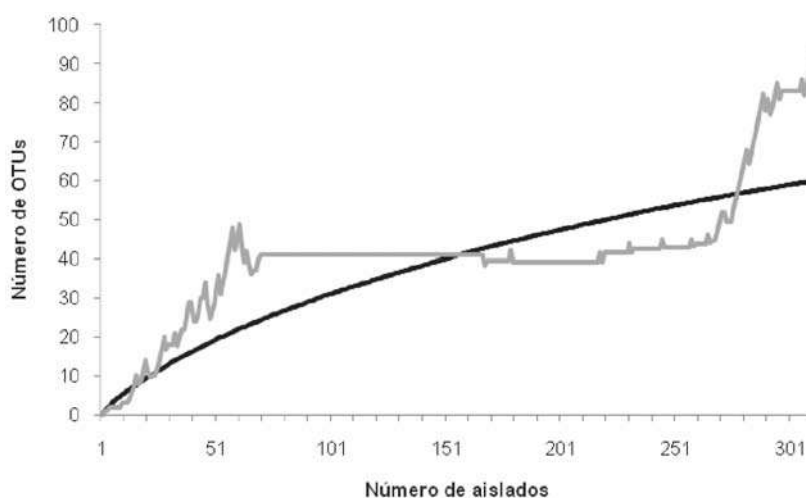
La diversidad de enterobacterias cultivables de las granjas se estimó tanto por el cálculo de índices de diversidad como mediante la curva de rarefacción. Usando el software DOTUR en un índice de diferenciación del 3% y subdividiendo a los aislados en comunidades por granja de procedencia, el número de OTUs por granja osciló entre 2 (granja 8) y 19 (granja 5) (Tabla 3), las granjas 2 y 3 fueron las que mostraron menos OTUs, 5 y 2, respectivamente, y la granja 7 mostró 19 OTUs. (Tabla 3). Los dos índices de diversidad calculados mostraron congruencia. En relación al índice de Simpson la granja 7 (0.812), seguida de cerca por la granja 8 (0.791), fueron las menos diversas, mientras que la granja 5 (0.130) fue la más diversa. De acuerdo al índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ), la granja 8 ( $H'=0.355$ ) fue la menos diversa y la granja 5 ( $H'=2.447$ ) presentó la mayor diversidad (ver discusión en relación a la interpretación de los resultados).

El análisis de rarefacción realizado graficando el número de OTUs agrupados a 97% de similitud contra el número de aislados secuenciados, mostró que la comunidad bacteriana de la granja 5 presenta una diversidad significativamente más grande que el resto de las comunidades presentes en las otras granjas, siendo la granja la granja 7 la que menos diversidad presentó. Esta observación es congruente con los parámetros de diversidad calculados, como el índice Shannon-Weaver y el

índice Simpson. Al considerar a todas las granjas como una sola comunidad, la riqueza observada fue de 60 OTUs (Fig. 2), con un índice de diversidad de Shannon-Weaver de 2.533 y un índice Simpson y 0.254. El estimador de riqueza Chao1 (93.461) predice que existen al menos 33 OTUs no observados (intervalo de confianza del 95% = 73.5081 a 142.889).

**Tabla 3.** Distribución de las especies de enterobacterias aisladas, número de OTUs e índices de diversidad por granja.

Especie	Granja								Total
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	
<i>Escherichia coli</i>	21	28	28	39	29	27	15	9	196
<i>Escherichia fergusonii</i>	2								2
<i>Shigella flexneri</i>	8		3		4	3	13	9	40
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1		1		1		1	6
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1		1					1	3
<i>Enterobacter cowanii</i>			1			1			2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1		1	1			1	1	5
<i>Brenneria rubrifaciens</i>	9	4	5	1	6	2	12	14	53
<i>Photobacterium luminescens</i>		3							3
OTUs	6	17	14	17	19	12	5	2	
Índice Simpson	0.604	0.206	0.345	0.145	0.130	0.341	0.812	0.791	
Índice Shannon-Weaver ( $H'$ )	0.844	2.127	1.707	2.314	2.447	1.638	0.454	0.355	



**Figura 2.** Curva de rarefacción para el número de OTUs encontrados en todas las granjas de estudio. Riqueza observada (línea negra) y estimada (línea gris) usando las secuencias del gen de la subunidad 16S de ARNr obtenidas de los 310 aislados.

La prueba de significancia UniFrac-U aplicada por comparación por pares de granjas, mostró que las diferencias entre la mayoría de las comunidades bacterianas de las granjas de estudio fueron estadísticamente significativas a un valor de  $P = 0.05$  (Tabla 4). En general, existe diferencia estadísticamente significativa en la comunidad bacteriana de la granja 2 con las comunidades bacterianas de las demás granjas. La diferencia entre las comunidades bacterianas de las granjas 3 y 4 no fue significativa. La prueba de significancia UniFrac-W mostró que existen diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de casi todas las granjas, a excepción de las granjas 1 y 8, en las que la diferencia de comunidades fue marginalmente significativa. Para datos ambientales complejos la prueba de significancia UniFrac a un valor de  $P$  entre 0.05 y 0.1 es considerada sugerente (Lozupone y Knight, 2005).

**Tabla 4.** Valores de  $P$  de la comparación de pares de ambientes de la prueba de significancia UniFrac-U y UniFrac-W para la comparación de comunidades entre granjas.

	UniFrac-U							UniFrac-W						
	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
G1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040
G2		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G3			0.710	0.080	0.380	0.170	0.000			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G4				0.290	0.380	0.000	0.000				0.000	0.000	0.000	0.000
G5					0.020	0.000	0.000					0.000	0.000	0.000
G6						0.000	0.000						0.000	0.000
G7							0.230							0.000

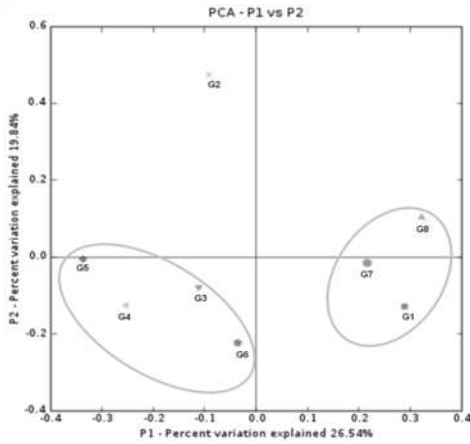
F1 a F8, granjas de la 1 a la 8.

(< 0.001) Altamente significativo; (0.001-0.01) Significativo; (0.01-0.05) Marginalmente significativo; (0.05-0.1) Sugerente y (>0.1) No significativo.

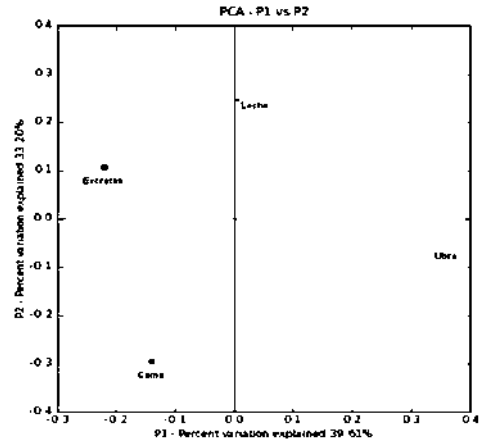
El análisis de coordenadas principales no ponderado de las granjas revela que las dos principales coordenadas explican el 46.38% de la varianza total. Al graficar estas dos primeras coordenadas se obtuvo la figura 3a, en la que se observa que este análisis distribuye a las granjas en 3 grupos, el primero formado por las granjas 3, 4, 5 y 6; el segundo grupo formado por las granjas 1, 7 y 8 y el último grupo formado por la granja 2. Al realizar el mismo análisis tomando los distintos tipos de muestras como ambientes (Fig. 3b), las dos primeras coordenadas explican el 72.81% de la varianza total, observándose que cada tipo de muestra forma un grupo independiente. El PCoA-W agrupó a las granjas en 4 grupos (Fig. 3c) uno formado

por las granjas 1, 7 y 8; otro por las granjas 4 y 5, el tercero por las granjas 3 y 6 y finalmente la granja 2 formando un solo grupo. En este caso las dos coordenadas principales explican el 89.99% de la varianza total. Mientras que en el PCoA-W de las muestras (Fig. 3d) se forman 3 grupos, uno formado por las excretas y el material de cama, otro por leche y el último por ubre. Las dos primeras coordenadas principales explican el 99.06% de la varianza total.

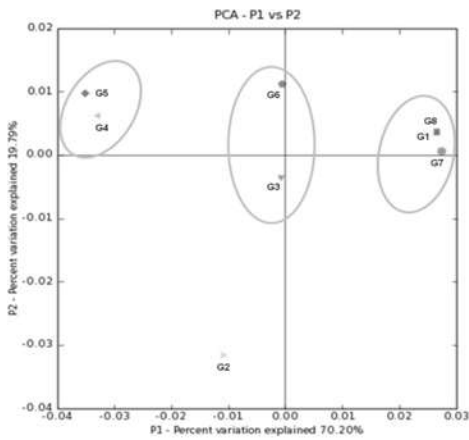
El dendograma de agrupamiento de ambientes mediante Unifrac-U por granjas (Fig. 4a) distribuyó a las granjas en 3 grupos, el primero conformado por las granjas 1, 7 y 8, el segundo por la granja 2 y el tercero por las granjas 3, 4, 5 y 6. Al realizar este análisis por tipo de muestra obtenemos la figura 4b, en la que se observa que cada muestra se separa del resto. Al analizar las granjas mediante agrupamiento de ambientes Unifrac-W (Fig. 4c), se obtuvieron 4 grupos, uno formado solo por la granja 2; otro formado por las granjas 1, 7 y 8; otro formado por la granja 3 y 6, y finalmente el último grupo que incluye a las granjas 4 y 5. En el agrupamiento UniFrac-W por tipo de muestra se obtienen 3 grupos, uno formado por ubre, el segundo formado por leche y el tercero conteniendo a material de cama y excretas. En todos los casos los resultados refuerzan la distribución mostrada por PCoA-U y PCoA-W, respectivamente.



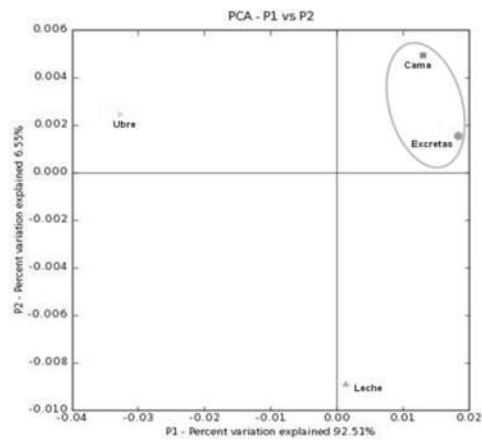
a



b

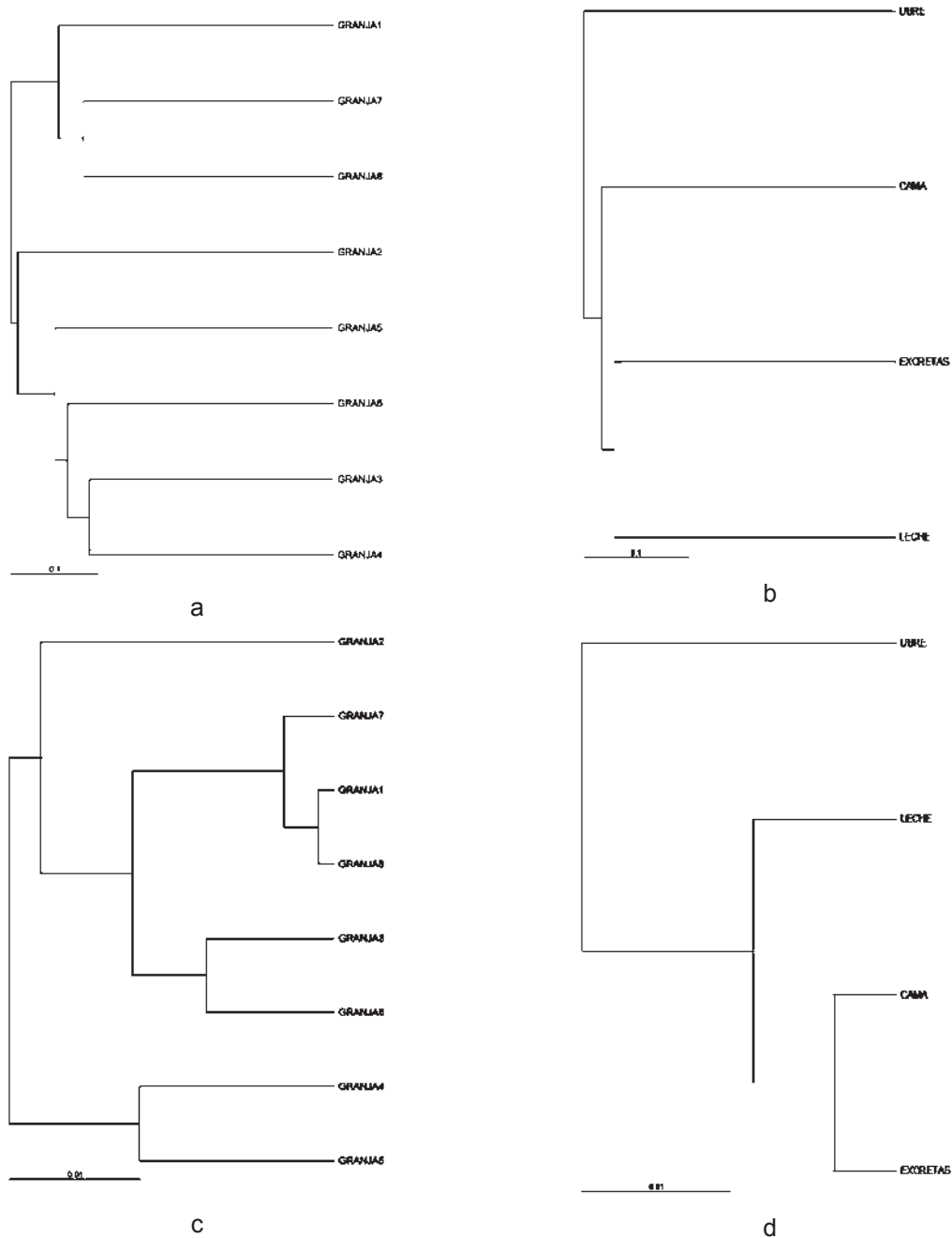


c



d

**Figura 3. Agrupamiento de las comunidades bacterianas por granjas y tipos de muestra mediante el análisis de coordenadas principales (PCoA).** Se muestran los gráficos de las dos primeras coordenadas generadas por el PCoA a partir de la matriz de distancias ambientales. PCoA-U comparando las comunidades bacterianas por granjas (a) y por tipos de muestra (b); PCoA-W comparando las comunidades bacterianas por granjas (c) y por tipos de muestra (d).



**Figura 4. Dendogramas que muestran las relaciones de las comunidades estudiadas por granjas y tipos de muestra.** Dendogramas generados del análisis UniFrac-U por granjas (a) y tipos de muestras (b). Dendogramas generados del análisis UniFrac-W por granjas (c) y tipos de muestra (d).

## V.2.4 DISCUSIÓN

No obstante que el método de aislamiento de enterobacterias empleado en este trabajo excluye a especies que requieren condiciones especiales para su crecimiento y que son de importancia en salud pública como *Salmonella enterica*, el

presente trabajo se buscaba obtener el mayor número posible de especies diferentes, y a la vez evaluar las diferencias en la comunidad de enterobacterias obtenidas mediante el mismo protocolo de aislamiento. El número cepas y la diversidad de especies aisladas permiten realizar inferencias sobre la higiene de las granjas estudiadas y evaluar el significado de las diferencias en la estructura de enterobacterias cultivables entre las distintas granjas.

En el presente trabajo las bacterias estudiadas fueron aisladas en medio rico LB y agar McConkey, mediante un tratamiento previo de las muestras ambientales (excreta, material de cama) en caldo LB. Se ha reportado que el tratamiento y dilución de muestras ambientales con medio líquido antes del plaqueo en agar, genera un mayor número de UFC que cuando la muestra se plaquea directamente, debido a que se disocian los agregados microbianos de la muestra (Lundholm, 1982; Chang *et al.*, 2001), por lo que este paso ha sido empleado para el aislamiento de enterobacterias de muestras ambientales (Ash *et al.*, 2002). La capacidad para formar agregados tipo biofilm en diferentes tipos de material y el ambiente natural está ampliamente documentada en enterobacterias (Jones y Bradshaw, 1996; Skandamis *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009; Balzer *et al.*, 2010) y algunas de estas pueden formar dichas estructuras en suelo (Cooper, 2010). Por otra parte, la obtención de colonias fue significativamente más alta en medio LB que en agar McConkey, recuperando al menos dos veces más colonias del primero que del segundo (datos no mostrados). Previamente se ha reportado que el aislamiento o recuperación de enterobacterias en medio mínimo o medio selectivo como el McConkey puede recuperar un menor número de UFC que el medio rico (Stewart, 1995), debido a que es imposible recuperar bacterias que traigan un daño metabólico (medio mínimo) o estructural de membrana o pared (medio selectivo). Por lo anterior, en determinados trabajos en los que se han aislado enterobacterias de muestras ambientales se hace uso del medio LB, incluyendo muestras de agua de río (Ash *et al.* 2002) y del tracto digestivo de insectos (Hirose *et al.*, 2006). Adicionalmente, cuando se ha intentado aislar bacterias Gram negativas del aire de granjas por siembra directa de la muestra en medio sólido, éstas no crecen (Wilson *et al.*, 2002), o lo hacen en muy baja proporción (Stewart *et al.*, 1995). Aunque en dichos trabajos una explicación posible

la da el método de muestreo, que implica el impacto con la superficie del medio, también se argumenta la menor resistencia a factores de estrés ambiental, como la desecación y el daño por radiación UV que tiene este grupo bacteriano. Un dato interesante es que en algunos de los estudios antes citados se usaron medios de aislamiento para enterobacterias distintos al agar McConkey, incluyendo medios ricos. Tomando en cuenta todo lo anterior, es posible afirmar que el uso de un paso de tratamiento con caldo LB y la siembra en el mismo medio sólido nos permitió incrementar las posibilidades de aislamiento del mayor número posible de especies y variaciones genéticas de enterobacterias de las granjas de estudio.

El uso del marcador filogenético 16S de RNAr para el análisis microbiano evidencia la presencia de especies de la familia *Enterobacteriaceae* en las granjas de producción lechera a pequeña escala estudiadas. La mayoría de las enterobacterias encontradas son de importancia en salud pública. La especie más abundante encontrada en todas las granjas y todos los tipos de muestra analizadas fue *Escherichia coli*. Dicha especie coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento (Drasar y Hill, 1974) considerándose microorganismo de la flora normal aunque puede causar infecciones gastrointestinales en sujetos inmunosuprimidos o cuando las barreras intestinales son superadas. De esta especie existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño, produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Las implicaciones de salud pública en relación a la presencia de este patógeno en particular en granjas lecheras se tratarán con mayor detalle en el capítulo III del presente trabajo.

*Escherichia fergusonii* fue propuesta como especie nueva por Farmer *et al.* (1985) y desde entonces ha sido asociada a distintos padecimientos en humanos, que incluyen cuadros diarreagénicos (Chaudhury *et al.*, 1999), septicemia (Freney *et al.*, 1987), como oportunista en carcinoma pancreático y colangiosépsis (Funke *et al.*, 1993) y en cistitis (Savini *et al.*, 2008; Lagacé-Wiens *et al.*, 2010), de infecciones en heridas, tracto urinario (Herrera *et al.*, 2001; Bours *et al.*, 2010). Adicionalmente, dicha especie ha sido también asociado a patologías en animales de granja, incluidos diarrea en cabras (Hariharan *et al.*, 2007), ovejas, vacas y caballos (Wragg



*et al.*, 2009), afecciones respiratorias en cerdos y ovejas (Wragg *et al.*, 2009) y lesiones glandulares gástricas en caballos (Husted *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, y al hecho de que esta especie puede portar genes de virulencia y resistencia a antibióticos presentes en cepas patógenas de *E. coli* y otras enterobacterias (Šmajš *et al.*, 2003; Rayamajhi *et al.*, 2011), *E. fergusonii* ha llegado a ser considerado un patógeno zoonótico emergente (Mahapatra *et al.*, 2005; Rayamajhi *et al.*, 2011). En la búsqueda realizada en la literatura especializada, no se encontró que esta bacteria haya sido aislada previamente del ambiente de granjas lecheras.

*Shigella flexneri* es el agente etiológico de shigellosis o disentería, una enfermedad diarreica aguda de tipo inflamatorio, considerada un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo, en donde afecta principalmente a la población económicamente menos favorecida (von Seidlein *et al.*, 2006). La baja cantidad de inóculo que puede producir la enfermedad, de solo 10 bacterias (DuPont, 1989), hace que esta especie sea altamente contagiosa. En los últimos 10 años las especies del género *Shigella* no han sido documentadas en granjas lecheras o a brotes asociados directamente con estos sistemas productivos. Un brote de enfermedad gastrointestinal asociada al consumo de un cuajo no pasteurizado ha sido reportado para *S. sonnei* (Zagrebneviene *et al.*, 2005).

Las infecciones humanas con *Klebsiella oxytoca* se parecen a las causadas por *Klebsiella pneumoniae*, que infecta los tractos urinarios y respiratorios (neumonía nosocomial), en adición a infecciones hepatobiliares y de tejidos suaves (Donnenberg, 2005). Hasta hace poco tiempo *K. oxytoca* no era considerada como patógeno intestinal, y su presencia en heces se reportaba como constituyente de la flora normal del tracto digestivo. Esta especie ha sido encontrada en casos de mastitis bovina clínica (Ahmed y Shimamoto, 2011), reportándose con alta frecuencia aislados multi resistentes, lo cual puede estar asociado con el hecho de que produce de manera constitutiva  $\beta$ -lactamasas, que le confieren resistencia a amino- y carboxipenicilinas (Livermore, 1995). Recientemente se ha reportado la presencia de especies del género *Klebsiella* en suelo, excretas, material de cama, las plumas de retención, muestras de agua y rumen de granjas lecheras, así como de los cultivos que sirven de alimento a las vacas (Zadoks *et al.*, 2011). En particular, en dicho

estudio *K. oxytoca* se aisló frecuentemente del suelo y del alimento. Los autores proponen con base en sus observaciones y la distribución de las especies estudiadas un ciclo de transmisión oral-fecal, en el que las heces del ganado contaminan el agua que beben y de esta manera pasan al tracto digestivo del animal (Zadoks *et al.*, 2011).

Las bacterias del género *Enterobacter* son importantes patógenos oportunistas humanos, responsables de infecciones nosocomiales que incluyen infecciones del tracto urinario, osteomielitis, coleocistitis y meningitis neonatal (Sanders y Sanders, 1997), de este género solo las especies del complejo *Enterobacter cloacae* (*E. hormaechei* y *E. cloacae*) son de importancia clínica (Hoffman *et al.*, 2005). El género *Enterobacter* no se encuentra documentado en el ambiente de granjas lecheras, aunque aislados de *Enterobacter* spp. (Miller *et al.*, 1993; Pinzón-Sánchez *et al.*, 2011) y específicamente aislados de *E. cloacae* (Malinowski *et al.*, 2006; Ahmed y Shimamoto, 2011) han sido asociados a mastitis clínica en algunos estudios. Estos organismos portan resistencia innata a antibióticos usados en décadas pasadas y tienen la habilidad de desarrollar resistencia rápidamente a nuevos agentes antimicrobianos (Sanders y Sanders, 1997).

Un hallazgo interesante es la presencia de *Photorhabdus luminescens*, la cual se presentó únicamente en el ambiente de la granja G2. Las especies del género *Photorhabdus* son consideradas simbioses de nemátodos entomopatógenos (Fischer-Le Saux *et al.*, 1999; Maneesakorn *et al.*, 2011), aunque algunas de estas se han encontrado asociadas a muestras clínicas desde hace varios años (Farmer *et al.*, 1989; Akhurst *et al.*, 2004), por lo que en la actualidad se consideran patógenos humanos emergentes (Gerrard *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2010). Aunque a la fecha las especies del género *Photorhabdus* no han sido encontradas en procesos patológicos en el hombre en México, quizá a futuro sea importante darle seguimiento a la presencia de dicha bacteria en el ambiente de las granjas y en las heces de los ordeñadores y demás trabajadores de las granjas estudiadas.

Los géneros y especies encontrados en el ambiente de las granjas estudiadas muestra que estas son un reservorio de bacterias patógenas de humano, algunas de las cuales pueden contaminar la leche obtenida. El haber encontrado patógenos

humanos como *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Klebsiella oxytoca* en muestras de leche, indica malas prácticas de manejo e higiene en las granjas de estudio. Desde hace más de dos décadas Phillips y Griffiths (1990) reportaban que las bacterias pueden ser introducidas en la leche debido a infecciones en la ubre o de fuentes ambientales durante el ordeño y procesamiento de la misma, esto debido a su alto valor nutricional, alto contenido de agua y pH cerca del neutro (Frank, 1997). Por otro lado, Winfield y Groisman (2003) han documentado que algunas especies de enterobacterias pueden sobrevivir afuera del hospedero por algún tiempo en el medio ambiente, promoviéndose así la transmisión a un nuevo hospedero.

Existen reportes de que el material de cama puede ser un importante fuente de exposición bacteriana de las ubres (Eckes *et al.*, 2001). Se ha visto que los tipos de bacterias y conteos encontrados en material de cama tienen una correlación positiva con los tipos de bacterias y conteos presentes en las ubres (Hogan y Smith, 1997; Zdanowicz *et al.*, 2004). y LeJeune y Kauffman (2005) Se ha observado que patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 y *Klebsiella* spp. persisten más tiempo cuando se usan derivados de madera (viruta y aserrín) que cuando se usa arena (Zdanowicz *et al.*, 2004; LeJeune y Kauffman, 2005). En el presente trabajo las especies *E. coli*, *S. flexneri* y *B. rubrifaciens* fueron encontradas en el material de cama de las granjas de estudio, el cual está compuesto de tierra, viruta de madera, rastrojo de maíz y excretas. Por otra parte, estas mismas especies fueron encontradas en las excretas frescas analizadas. Es posible que el uso de excreta en el material de cama tenga un efecto amortiguador que permite que las bacterias permanezcan viables más tiempo en el suelo del material de cama. No obstante, es necesario realizar pruebas experimentales de sobrevivencia de las bacterias identificadas en el material de cama de las granjas de estudio, con el fin de corroborar dicha hipótesis. El contenido de enterobacterias en excretas de ganado bovino ha sido ampliamente documentado (Pell, 1997; Jones, 1999, Geser *et al.*, 2011), por lo tanto el contacto directo de las ubres con las excretas puede proveer a las bacterias acceso a la ubre, que al final puede resultar en infección intramamaria (Bramley y Neave, 1975; DeHart *et al.*, 1976). Por ello las heces de ganado son consideradas la fuente primaria de contaminación del alimento, el ganado y el

ambiente de la granja (Trevena *et al.*, 1996; O'Brien *et al.*, 2001;). Además de mezclarse con el suelo natural del ambiente de la granja para ser utilizado como material de cama, las excretas son también empleadas como abono en los cultivos de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*) y alfalfa (*Medicago sativa*) destinados a la alimentación del hato (ver Capítulo I). El tiempo de permanencia de las excretas en las granjas de estudio varía desde 1 día hasta un año, en ese sentido es factible que suponer que a mayor tiempo de permanencia en la granja, mayor es el riesgo de contaminación de la leche.

La especie *Brenneria rubrifaciens* es considerada una enterobacteria fitopatogena (Brown *et al.*, 2000). El haber encontrado a dicha especie en todos los tipos de muestra de todas las granjas de estudio, sugiere un ciclo de contaminación granja-parcela ocasionado por la movilización de excreta a los cultivos y la movilización de la cosecha obtenida a la granja. Esto plantea la hipótesis de que las bacterias patógenas de humanos y ganado encontradas también puedan ir de la granja a la parcela, diseminándose de esta forma al ambiente. Esto es algo que debe de ser analizado con mayor detalle a futuro. Es deseable que en las granjas de estudio se implemente un programa de composteo con las excretas que permita mejorar la calidad del abono destinado a los cultivos y disminuya la presencia de bacterias patógenas, propuesta que ha sido ampliamente analizada y documentada en granjas lecheras en otras partes del mundo (Bernal *et al.*, 2009).

Aunque es controversial que grado de similitud entre secuencias define la misma especie, las secuencias con una identidad mayor a 97% son generalmente asignadas a la misma especie y aquellas con más del 95% de similitud son típicamente asignadas al mismo género (Schloss y Handelsman, 2005). Un aspecto interesante del análisis de riqueza con las herramientas analíticas aquí empleadas es que permite establecer hipótesis sobre el nivel de cobertura de la comunidad de enterobacterias cultivables estudiada, en este caso el estimador de riqueza Chao1 predijo que existen al menos 33 OTUs no observados. Este tipo de datos pueden llevar a corregir o incrementar la intensidad de muestreos con la finalidad de describir con mayor precisión la comunidad de interés. No obstante, la pendiente de la curva de riqueza observada indica que el inventario realizado es riguroso y fiable, ya que

cuando está pendiente desciende a cero corresponde, teóricamente, con el número total de especies que podemos encontrar en la zona estudiada, con la estrategia de muestreo y análisis utilizada. Por otra parte, es importante tener en consideración que un inventario total nunca llega a completarse, debido a las características espacio-ambientales del área de trabajo, por lo que la estima final del número de especies depende de la resolución temporal y espacial que empleemos en el muestreo (Adler y Lauenroth, 2003).

La razón por la que el análisis UniFrac muestra un número de OTUs considerablemente más grande que el número de especies identificadas mediante la búsqueda Blastn en el GenBank se encuentra en las diferencias en las que las dos estrategias hacen el análisis. Mientras que la búsqueda Blastn se basa en alineamientos por pares de secuencias, el software UniFrac se basa en el análisis del alineamiento múltiple de todas las secuencias de estudio. Adicionalmente, en este último, el corte para considerar dos secuencias pertenecientes al mismo OTU fue cuando el valor de la identidad fuera  $\geq 97\%$ , mientras que la identidades de la búsqueda Blastn oscilaron entre 95 y 100%. Estas diferencias ocasionan que algunas de las secuencias asignadas por la búsqueda Blastn a una misma especie sean asignadas en distinto OTU por el paquete UniFrac. No obstante, como todas las comunidades de las granjas y muestras de estudio están sujetas al mismo proceso de análisis, la aplicación del paquete UniFrac constituye una herramienta importante para el análisis de las comunidades de interés.

Diversos trabajos han combinado las técnicas microbiológicas tradicionales de cultivo y aislamiento con herramientas de tipificación genético-molecular para el análisis de la comunidad bacteriana en distintos tipos de ambientes. Así, dicha aproximación ha permitido evaluar la diversidad de bacterias heterotróficas asociadas a cuerpos de agua colonizados por cianobacterias, algunas de las cuales presentaron potencial biotecnológico (Berg *et al.*, 2009), conocer la diversidad de bacterias del filum *Acidobacteria* en distintos tipos de suelo (Eichorst *et al.*, 2011), y el estudio de bacterias desnitrificantes en plantas de tratamiento de residuos (Heylen *et al.*, 2006). En granjas lecheras, se han aislado bacterias de polvo y aire relacionadas con procesos de asma, las cuales posteriormente fueron identificadas

mediante el análisis de la secuencias del gen de la subunidad 16S de rRNA (Normand *et al.*, 2009). En estos trabajos se asignan los aislados obtenidos a cladas filogenéticas mediante el uso del gen de la subunidad ribosomal 16S y se caracterizan fisiológicamente algunos aislados pertenecientes a cladas de interés, encontrando así patrones que permiten encontrar cepas con potencial biotecnológico o de importancia clínica. De manera complementaria, la asignación de los aislados bacterianos a cladas filogenéticas mediante marcadores moleculares en combinación con estudios fisiológicos y de determinantes genéticos asociados a dicha fisiología puede ayudar a entender mejor la ecología de las comunidades o poblaciones analizadas. Siguiendo la estrategia de los trabajos anteriormente citados, en este trabajo se logró identificar a distintas especies de enterobacterias asociadas a problemas de salud pública en México e identificar a *E. coli* como la enterobacteria cultivable más abundante en las granjas y muestras de estudio. A partir de estos datos fue posible realizar un análisis de la estructura genética de la población de *E. coli* (Capítulo III), e identificar los patotipos más comunes así como los patrones de resistencia a antibióticos y los determinantes genéticos asociados a dicha resistencia (Capítulo IV). Adicionalmente, en el presente trabajo se realizó un análisis de la comunidad de enterobacterias cultivables, una aproximación ecológica que no ha sido empleada con anterioridad en estudios epidemiológicos o de salud pública. Es de esperarse que la incorporación de dichas herramientas a la epidemiología molecular contribuya a expandir los alcances teóricos y prácticos de dicha disciplina.

Los índices de diversidad calculados permiten realizar una primera aproximación al conocimiento de la estructura de la comunidad de enterobacterias cultivables estudiada. Ambos índices evalúan la diversidad o heterogeneidad de una comunidad combinando el cálculo de riqueza (proporción de la muestra que es variable o bien número de OTUs, secuencias 16S en este caso, que son distintos dentro de la comunidad muestreada) con el de equidad (la distribución de OTUs dentro de la comunidad). La combinación de estos parámetros en los índices calculados permite describir con mayor precisión la diversidad o heterogeneidad de una comunidad, ya que en dos comunidades distintas con una misma riqueza una de estas puede estar compuesta con pocos OTUs altamente representados (gran

número de individuos) con otros tantos OTUs raros (con pocos individuos) y la otra comunidad puede tener a los individuos de la muestra equitativamente distribuidos entre los OTUs descritos. De acuerdo al cálculo del índice de Simpson realizado en este trabajo, los valores obtenidos para este parámetro reflejan la probabilidad de que dos secuencias del gen de la subunidad 16S de ARNr seleccionadas al azar pertenezcan al mismo OTU. Los valores de dicho índice oscilan entre 0 y 1, siendo cercanos a 1 cuando la probabilidad de que dos secuencias pertenezcan al mismo OTU es muy alta (baja heterogeneidad). En el caso del índice de Shannon-Weaver, el valor de éste se vuelve más grande cuando existe una alta probabilidad de que cada individuo muestreado dentro de una comunidad pertenezca a un OTU distinto.

Al tomar a las bacterias de todas las granjas estudiadas como una sola comunidad los índices de diversidad de Shannon-Weaver (2.533) y de Simpson (0.254), indican que ésta es diversa. Al tomar las enterobacterias por granja de procedencia como comunidad el valor de los dos índices coinciden en mostrar a la granja 5 como la más diversa y a la granja 8 como la menos diversa. Las comparaciones de los índices de diversidad obtenidos en este trabajo con lo reportados en la literatura no pueden realizarse directamente, ya que comúnmente el cálculo de índices se hace con base en clonas de genes 16S obtenidos mediante PCR a partir de ADN genómico aislado de directamente de las muestras, y no de los aislados como en este caso.

El índice de diversidad de Shannon-Weaver ofrece la posibilidad de asociar la diversidad con una amplia gama de variables en diferentes ecosistemas; por ejemplo el valor de  $H'$  ha sido utilizado para asociar la estructura de las comunidades bacterianas en relación al pH del suelo en distintos ecosistemas, desde desiertos a selvas (Fierer y Jackson, 2006). Además éste índice tiene la ventaja de que se puede calcular con muestras definidas en jerarquías taxonómicas incluyendo especies, géneros o familias. Esto puede ser de gran utilidad en el estudio de comunidades bacterianas de granjas lecheras ya que bajo esquemas de muestreo adecuados se puede relacionar la estructura de la comunidad de enterobacterias, o de cualquier otro grupo de interés, con variables de manejo, temperatura y factores socio-



culturales. Sin duda que esto sería de gran utilidad para el diseño de prácticas de manejo y estrategias de minimización de riesgos para la contaminación de la leche.

El análisis UniFrac reforzó los resultados del análisis DOTUR, pero permitió disectar la diversidad  $\beta$  de la comunidad de granjas estudiadas en sus componentes cualitativo (riqueza) y cuantitativo (riqueza y distribución, ya que mientras que el primero lo mide el UniFrac-U, el segundo está determinado por el UniFrac-W. El PCoA-U, mientras que el PCoA-W en cuatro grupos. Por otro lado, en ambos tipos de análisis la granja 2 se separa del resto de grupos.

El análisis Unifrac-U no toma en cuenta las abundancias relativas de los OTUs dentro de cada una de las comunidades estudiadas, sino solo las diferencias en el número de OTUs distintos entre estas. En ese sentido dicho parámetro es útil para encontrar diferencias relacionadas en el origen de una población fundadora, o bien los efectos de factores que restringen el crecimiento bacteriano, como la temperatura (Lozupone *et al.*, 2007). El PCoA-U agrupó a las granjas en tres grupos compuestos por las granjas 1, 7 y 8; otro por las granjas 3, 4, 5 y 6 y finalmente otro por la granja 2. La prueba P de dicho agrupamiento resultó estadísticamente significativa. Esto indica o bien que los OTUs de las granjas dentro de cada grupo tienen una misma fuente, o bien que en estas granjas existen condiciones microclimáticas semejantes que favorecen el desarrollo de una comunidad de enterobacterias similar. Aunque ambas hipótesis son factibles, los resultados sugieren que las condiciones de operación tienen un efecto sobre la estructura de las comunidades bacterianas de las granjas de estudio, posiblemente en combinación con el microambiente. Las granjas con estructuras de comunidad similares están relacionadas con personal de trabajo y/o movilización de alimento (discusión general, Capítulo VI). En contraste, la granja 2, no comparte ni personal de ordeño ni alimento con otras granjas, y es la única en la que el ordeño se lleva a cabo totalmente de forma manual. Dada el área tan restringida sobre la cual se llevó a cabo este estudio, es poco probable que existan variaciones climáticas significativamente distintas entre las granjas de estudio, aunque microclimas generados por las diferencias en infraestructura entre las granjas estudiadas (presencia o no de tejabán, tipo de piso, etc., ver Capítulo I),



podieran influir en las diferencias o similitudes encontradas en las comunidades de enterobacterias.

Por su parte, la prueba UniFrac-W, que toma en cuenta la abundancia relativa de los OTUs entre las comunidades comparadas, puede revelar los efectos de factores ambientales transitorios sobre la estructura de las comunidades, como la disponibilidad de nutrientes, fluctuaciones estacionales, o variaciones en la concentración de algún contaminante (Lozupone *et al.*, 2007). El PCoA-W agrupó a las granjas de estudio en cuatro grupos, no obstante, la prueba P indicó que las diferencias en la estructura de las comunidades no es significativa. Esto indica que dichos factores transitorios no son determinantes para diferenciar la estructura de las comunidades de enterobacterias de las granjas estudiadas, lo que refuerza la hipótesis de que las prácticas de manejo son el factor principal de las diferencias observadas.

## V.2.5 REFERENCIAS

- Acar J. F., and Moulin G. 2006. **Antimicrobial resistance at farm level**. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizooties)* 25:775-792.
- Adler P. B., and Lauenroth W. K. 2003. **The power of time: spatiotemporal scaling of species diversity**. *Ecology Letters* 6:749:756.
- Ahmed A. M., and Shimamoto T. 2011. **Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt**. *Microbiology and Immunology* 55:318-327.
- Akhurst R. J., Boemare N. E., Janssen P. H., Peel M. M., Alfredson D. A., and Beard C. E. 2004. **Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *Asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *Australis* subsp. nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1301-1310.
- Allos B. M. 2001. ***Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends**. *Clinical Infectious Diseases* 32:1201-1206.

- Armstrong G. L., Hollingsworth J., and Morris J. G. 1996. **Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world.** *Epidemiologic Reviews* 18:29-51.
- Ash R. J., Mauck B., and Morgan M. 2002. **Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria in Rivers, United States.** *Emerging Infectious Diseases* 8:713-716.
- Balzer M., Witt N., Flemming H. C., and Wingender J. 2010. **Faecal indicator bacteria in river biofilms.** *Water Science and Technology* 61:1105-11.
- Bednarski M., Wieliczko A., and Mazurkiewicz M. 2011. **Genetic comparison of *Campylobacter jejuni* isolated from different cattle farms.** *Polish Journal of Veterinary Science* 14:279-81.
- Berg K. A., Lyra C., Sivonen K., Paulin L., Suomalainen S., Tuomi P., and Rapala J. 2009. **High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms.** *The ISME Journal* 3:314-325.
- Bernal M. P., Albuquerque J. A., and Moral R. 2009. **Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review.** *Bioresource Technology* 100:5444-5453.
- Bours P. H., Polak R., Hoepelman A. I., Delgado E., Jarquin A., and Matute A. J. 2010. **Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines.** *International Journal of Infectious Diseases* 14:770-4.
- Bramley A. J., and Neave F. K. 1975. **Studies on the control of coliform mastitis in dairy cows.** *British Veterinary Journal* 131:160-169.
- Brown E. W., Davis R. M., Gouk C., and van der Zwet T. 2000. **Phylogenetic relationships of necrogenic *Erwinia* and *Brenneria* species as revealed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:2057-2068.

- Capurro A., Aspán A., Artusson K., and Waller K. P. 2010. **Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows.** *The Veterinary Journal* 185:188-92.
- Chang C. W., Chung H., Huang C. F., and Su H. J. J. 2001. **Exposure of Workers to Airborne Microorganisms in Open-Air Swine Houses.** *Applied and Environmental Microbiology* 67:155-161.
- Chao A. 1987. **Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability.** *Biometrics* 43:783-791.
- Chaudhury A., Nath G., Tikoo A., and Sanyal S. C. 1999. **Enteropathogenicity and Antimicrobial Susceptibility of New *Escherichia* spp.** *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 17: 85-87.
- Cooper I. R. 2010. **Microbial biofilms: case reviews of bacterial and fungal pathogens persisting on biomaterials and environmental substrata.** In A. Méndez-Vilas Editor, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. FORMATEX. pp. 807-817.
- Coorevits A., De Jonghe V., Vandroemme J., Reekmans R., Heyrman J., Messens W., De Vos P., and Heyndrickx M. 2008. **Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms.** *Systematic and Applied Microbiology* 31:126-140.
- Costa S. C., Chavez C. V., Jubelin G., Givaudan A., Escoubas J. M., Brehélin M., Zumbihl R. 2010. **Recent insight into the pathogenicity mechanisms of the emergent pathogen *Photorhabdus asymbiotica*.** *Microbes and Infection* 12:182-189.
- Crump J. A., Sulka A. C., Langer A. J., Schaben C., Crielly A. S., Gage R., Baysinger M., Moll M., Withers G., Toney D. M., Hunter S. B., Hoekstra M., Wong S. K., Griffin P. M., and Van Gilder T. J. 2002. **An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm.** *The New England Journal of Medicine* 347:555-560.
- D'Amico D. J., Groves E., Donnelly C. W. 2008. **Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production.** *Journal of Food Protection* 71:1580-1589.

- Davis M. A., Hancock D. D., Besser T. E., Rice D. H., Hovde C. J., Digiacomio R., Samadpour M., and Call D. R. 2003. **Correlation between geographic and genetic similarity in an international collection of bovine faecal *Escherichia coli* O157:H7 isolates.** *Epidemiology and Infection* 131:923-930.
- DeHart D. A., Natzke R. P., and Oltenacu P. A. 1976. **Effect of coliform challenge at milking time on new udder infections.** *Journal of Dairy Science* 59:1124-1130.
- Delbès C., Ali-Mandjee L., and Montel M. C. 2007. **Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses.** *Applied and Environmental Microbiology* 73:1882-1891.
- Donnenberg M. S. 2005. **Enterobacteriaceae**, In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Bennett's Principles and practice of infectious diseases.*, 6th ed. Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, PA. pp. 2567–2586.
- Doyle M. P., and Erickson M. C. 2006. **Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry.** *Poultry Science* 85:960-973.
- DuPont H. L., Levine M. M., Hornick R. B., and Formal S. B. **Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmissions.** *Journal of Infectious Diseases* 1989:1126-8.
- Durso L. M., Harhay G. P., Smith T. P. L., Bono J. L., DeSantis T. Z., and Clawson M. L. 2011. **Bacterial community analysis of beef cattle feedlots reveals that pen surface is distinct from feces.** *Foodborne Pathogens and Disease* 8:647-649.
- Eckes V., LaValle M., Bey R. F., Farnsworth R. J., and Reneau J. K. 2001. **Environmental mastitis pathogens in fresh bedding material.** Pages 183-184 in Proc. Natl. Mastitis Counc. Reg. Meet. Proc., Reno, NV. Natl. Mastitis Counc. Inc., Arlington, VA.
- Eichorst S. A., Kuske C. R., and Schmidt T. M. 2011. **Influence of Plant Polymers on the Distribution and Cultivation of Bacteria in the Phylum *Acidobacteria*.** *Applied and Environmental Microbiology* 77:586-596.

- Elder R. O., Keen J. E., Siragusa G. R., Barkocy-Gallagher G. A., Koohmaraie M., and Laegreid W. W. 2000. **Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces hides and carcasses of beef cattle during processing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:2999-3003.
- Eriksson E., Aspan A., Gunnarsson A., and Vågsholm I. 2005. **Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds.** *Epidemiology and Infection* 133:349-358.
- Farmer J. J. I., Fanning G. R., Davis B. T., O'hara C. M., Riddle C., Hickman-Brenner F. W., Asbury M. A., Lowery V. A. I., and Brenner D. J. 1985. ***Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.** *Journal of Clinical Microbiology* 21:77-81.
- Farmer J. J. III, Jorgensen J. H., Grimont P. A. D., Akhurst R. J., Poinar G. O. Jr., Ageron E., Pierce G. V., Smith J. A., Carter C. P., Wilson K. L., and Hickman-Brenner F. W. 1989. ***Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens.** *Journal of Clinical Microbiology* 27:1594-1600.
- Fetrow J., Stewart S., Eicker S., Farnsworth R., and Bey R. 2000. **Mastitis: An economic consideration.** Pages 3–47 in Proc. 39<sup>th</sup> Annu. Mtg. Natl. Mastitis Council. Natl. Mastitis Council, Inc., Madison, WI.
- Fierer N., and Jackson R. B. 2006. **The diversity and biogeography of soil bacterial communities.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:626-631.
- Fischer-Le Saux M., Viillardt V., Brunelt B., Normand P., and Boemarel N. E. 1999. **Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:1645-1656.

- Frank J. F. 1997. **Milk and dairy products**. Pages 101-116 in Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers. P. Doyle, R. Beuchat and J. Montville, ed. ASM Press, Washington DC, USA.
- Freney J., Gavini F., Ploton C., Leclerc H., and Fleurtte J. 1987. **Isolation of *E. fergusonii* from a patient with septicemia in France**. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 6:78.
- Fukushima H., and Seki R. 2004. **High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan**. *FEMS Microbiology Letters* 238:189-197.
- Funke G., Hany A., and Altwegg M. 1993. **Isolation of *Escherichia fergusonii* from Four Different Sites in a Patient with Pancreatic Carcinoma and Cholangiosepsis**. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2201-2203.
- Gerrard J., Waterfield N., Vohra R., French-Constant R. 2004. **Human infection with *Photobacterium asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen**. *Microbes and Infection* 6:229-37.
- Geser N., Stephan R., Kuhnert P., Zbiden R., Kaeppli U., Cernela N., and Haechler H. 2011. **Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in swine and cattle at slaughter in Switzerland**. *Journal of Food Protection* 74:446-9.
- Giraffa G., and Rossetti L. 2004. **Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR**. *FEMS Microbiology Letters* 237:133-138.
- Granum P. E. 2001. ***Bacillus cereus***. Pages 373 – 381 in Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville, ed. ASM Press, Washington, DC.
- Gyles C. L. 2007. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview**. *Journal of Animal Science* 85:45-62.
- Hariharan H., López A., Conboy G., Coles M., and Muirhead T. 2007. **Isolation of *Escherichia fergusonii* from the feces and internal organs of a goat with diarrhea**. *Canadian Veterinary Journal* 48:630-631.

- Hassan L., Mohammed H. O., McDonough P. L., and Gonzalez R. N. 2000. **A cross-sectional study on prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds.** *Journal of Dairy Science* 83:2441-2447.
- Herrera M., Moya T., Vargas A., Herrera M., Herrera J. F. y Marín J. P. 2001. **Aislamiento de cepas de *Escherichia* spp. diferentes de *Escherichia coli* en el Hospital Nacional de Niños de 1995 a 2000.** *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera* 36:45-49.
- Heylen K., Vanparys B., Wittebolle L., Verstraete W., Boon N., and De Vos P. 2006. **Cultivation of Denitrifying Bacteria: Optimization of Isolation Conditions and Diversity Study.** *Applied and Environmental Microbiology* 72:2637-2643.
- Hirose E., Panizzi A. R., De Souza G. T., Cattelan A. J., and Aldrich J. R. 2006. **Bacteria in the Gut of Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae).** *Annals of the Entomological Society of America* 99:91-95.
- Hoffman H., Stindl S., Ludwig W., Stumpf A., Mehlen A. 2005. **Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. Nov and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*.** *Systematic and Applied Microbiology* 28:196-205.
- Hogan J., and Smith L. 1997. **Bacteria counts in sawdust bedding.** *Journal of Dairy Science* 80:1600-1605.
- Hold G. L., Pryde S. E., Russell V. J., Furrie E., and Flint H. J. 2002. **Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis.** *FEMS Microbiology Ecology* 39:33-39.
- Hughes J. 2001. **A system for assessing cow cleanliness.** *In Practice* 23:517-524.
- Hughes J. B., Hellmann J. J., Ricketts T. H., and Bohannon B. J. 2001. **Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity.** *Applied and Environmental Microbiology* 67:4399-4406.
- Husted L., Jensen T. K., Olsen S. N., and Mølbak L. 2010. **Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Helicobacter* spp by fluorescence in situ hybridization.** *BMC Microbiology* 10:84.



- Jayarao B. M., and Henning D. R. 2001. **Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk.** *Journal of Dairy Science* 84:2157-2162.
- Jayarao B. M., Donaldson S. C., Straley B. A., Sawant A. A., Hegde N. V., and Brown J. L. 2006. **A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania.** *Journal of Dairy Science* 89:2451-2458.
- Jones K, Bradshaw SB. 1996. Biofilm formation by the enterobacteriaceae: a comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *J Appl Bacteriol.* 80(4):458-64.
- Jones D. L. 1999. **Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments.** *Soil Use and Management* 15:76-83.
- Kaper J. B., Nataro J. P., and Mobley H. L. 2004. **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nature Reviews Microbiology* 2:123-140.
- Keller M. and Zengler K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology* 2:141-150.
- Kikuchi N., Kagota C., Nomura T., Hiramune T., Takahashi T., and Yanagawa R. 1995. **Plasmid profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology* 47:9-15.
- Kobayashi H., Shimada J., Nakazawa M., Morozumi T., Pohjanvirta T., Pelkonen S., and Yamamoto K. 2001. **Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan.** *Applied and Environmental Microbiology* 67:484-489.
- Lagacé-Wiens P. R., Baudry P. J., Pang P., and Hammond G. 2010. **First description of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* strain in a patient with cystitis.** *Journal of Clinical Microbiology* 48:2301-2.
- LeJeune J. T., and Kauffman M. D. 2005. **Effect of sand and sawdust bedding materials on the fecal prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cows.** *Applied and Environmental Microbiology* 71:326-330.



- LeJeune J. T., and Rajala-Schultz P. J. 2009. **Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat.** *Clinical Infectious Diseases* 48:93-100.
- Liebana E., Smith R. P., Lindsay E., McLaren I., Cassar C., Clifton-Hadley F. A., and Paiba G. A. 2003. **Genetic diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from bovines living on farms in England and Wales.** *Journal of Clinical Microbiology* 41:3857-3860.
- Little C. L., Rhoades J. R., Sagoo S. K., Harris J., Greenwood M., Mithani V., Grant K., and McLauchlin J. 2008. **Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK.** *Food Microbiology* 25:304-312.
- Livermore D. M. 1995. **beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.** *Clinical Microbiology Reviews* 8:557-84.
- Lozupone C., and Knight R. 2005. **UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities.** *Applied and Environmental Microbiology* 71:8228-8235.
- Lozupone C., Hamady M., and Knight R. 2006. **UniFrac an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context.** *BMC Bioinformatics* 7:371.
- Lozupone C. A., Hamady M., Kelley S. T., and Knight R. 2007. **Quantitative and Qualitative  $\beta$  Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities.** *Applied and Environmental Microbiology* 73:1576-1585.
- Lundholm I. M. 1982. **Comparison of methods for quantitative determinations of airborne bacteria and evaluation of total viable counts.** *Applied and Environmental Microbiology* 44:179-183.
- Magurran A. E. 1996. **Ecological diversity and its measurement.** Chapman and Hall, London. pp. 274–286.
- Mahapatra A., Mahapatra S., and Mahapatra A. 2005. ***Escherichia fergusonii*: an emerging pathogen in South Orissa.** *Indian Journal of Medical Microbiology* 23:204.

- Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Smulski S., Markiewicz H., and Kaczmarowski M. 2006. **Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland.** *Polish Journal of Veterinary Sciences* 9:191-4.
- Maneesakorn P., An R., Daneshvar H., Taylor K., Bai X., Adams B. J., Grewal P. S., and Chandrapatya A. 2011. **Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis: Rhabditida*) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus: Enterobacteriaceae*).** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59:271-80.
- Martins M. L., Pinto C. L. O., Rocha R. B., de Araujo E. F., and Vanetti M. C. D. 2006. **Genetic diversity of Gram negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk.** *International Journal of Food Microbiology* 111:144 – 148.
- Mekonnen H., Dehninet G., and Kelay B. 2010. Dairy technology adoption in smallholder farms in “Dejen” district, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 42:209-216.
- Miller G. Y., Bartlett P. C., Lance S. E., Anderson J., and Heider L. E. 1993. **Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds.** *Journal of American Veterinary Medical Association* 202:1230-1236.
- Morandi S., Brasca M., Lodi R., Cremonesi P., and Castiglioni B. 2007. **Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products.** *Veterinary Microbiology* 124:66-72.
- Munoz M. A., and Zadoks R. N. 2007. **Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows.** *Journal of Dairy Science* 90:1220-1224.
- Munoz M. A., Bennett G. J., Ahlström C., Griffiths H. M., Schukken Y. H., and Zadoks R. N. 2008. **Cleanliness scores as indicator of *Klebsiella* exposure in dairy cows.** *Journal of Dairy Science* 91:3908-3916.
- Musalía L. M., Wangia S. M. M., Shivairo R. S., Okutu P., and Vugutsa V. 2007. **Dairy production practices among smallholder dairy farmers in Butere/Mumias and Kakamega districts in Western Kenya.** *Tropical Animal Health and Production* 39:199-205.

- Nam H. M., Murinda S. E., Nguyen L. T., and Oliver S. P. 2004. **Evaluation of universal pre-enrichment broth for isolation of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* from dairy farm environmental samples.** *Foodborne Pathogens and Disease* 1:37-44.
- Nataro J. P., and Kaper J. B. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.
- Normand A. C., Vacheyrou M., Sudre B., Heederik D. J. J., and Piarroux R. 2009. **Assessment of Dust Sampling Methods for the Study of Cultivable-Microorganism Exposure in Stables.** *Applied and Environmental Microbiology* 75:7617-7623.
- O'Brien S. J., Adak G. K., and Gilham C. 2001. **Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans.** *Emerging Infectious Diseases Journal* 7:1049-1051.
- Oliver S. P., Jayarao B. M., and Almeida R. A. 2005. **Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications.** *Foodborne Pathogens and Disease* 2:115-129.
- Paulin-Curlee G. G., Singer R. S., Sreevatsan S., Isaacson R., Reneau J., Foster D., and Bey R. 2007. **Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows.** *Journal of Dairy Science* 90:3681-3689.
- Pell A. N. 1997. **Manure and microbes: public and animal health problem.** *Journal of Dairy Science* 80:2673-2681.
- Phillips J. D., and Griffiths M. W. 1990. **Pasteurized dairy products: the constraints imposed by environmental contamination.** in Food Contamination from Environmental Sources. J. O. Nriagu and M. S. Simmons, ed. Wiley, USA. pp. 387-456.
- Pinzón-Sánchez C., Ruegg P. L. 2011. **Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis.** *Journal of Dairy Science* 94:3397-3410.

- Pradhan A. K., Van Kessel J. S., Karns J. S., Wolfgang D. R., Hovingh E., Nelen K. A., Smith J. M., Whitlock R. H., Fyock T., Ladely S., Fedorka-Cray P. J., and Schukken Y. H. 2009. **Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern United States.** *Journal of Dairy Science.* 92:1811-1825.
- Raats D., Offek M., Minz D., and Halpern M. 2011. **Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics.** *Food Microbiology* 28:465-71.
- Rayamajhi N., Cha S. B., Shin S. W., Jung B. Y., Lim S. K., and Yoo H. S. 2011. **Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other Enterobacteriaceae isolates from south Korean farm animals.** *Applied and Environmental Microbiology* 77:3163-6.
- Reneau J. K., Seykora A. J., Heins B. J., Endres M. I., Farnsworth R. J., and Bey R. F. 2005. **Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle.** *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227:1297-1301.
- Renter D. G., and Sargeant J. M. 2002. **Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: epidemiology and ecology in bovine production environments.** *Animal Health Research Reviews* 3:83-94.
- Rosales-Castillo Jesús Andrei, Vázquez Garcidueñas Ma. Soledad, Álvarez Hernández Hugo, Chassin Noria Omar, Varela Murillo Alba Irene, Zavala Páramo María Guadalupe, Cano Camacho Horacio, and Vázquez Marrufo Gerardo. 2011. **Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* from neighboring small-scale dairy farms.** *The Journal of Microbiology* DOI 10.1007/s12275-011-0461-2
- Sabat G., Rose P., Hickey W. J., and Harkin J. M. 2000. **Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil.** *Applied and Environmental Microbiology* 66:844-849.
- Sambrook J., and Russell D. W. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**, vol. 1, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Sanders W. E. Jr, and Sanders C. C. 1997. **Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century.** *Clinical Microbiology Reviews* 10:220–241.
- Savini V., Catavitello C., Talia M., Manna A., Pompetti F., Favaro M., Fontana C., Febbo F., Balbinot A., Di Bernardino F., Di Bonaventura G., Di Zacomo S., Esattore F., and D'Antonio D. 2008. **Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis.** *Journal of Clinical Microbiology* 46:1551-1552.
- Sawant A. A., Hegde N. V., Straley B. A., Donaldson S. C., Love B. C., Knabel S. J., and Jayarao B. M. 2007. **Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle.** *Applied and Environmental Microbiology* 73:156-163.
- Schloss P. D., and Handelsman J. 2004. **Status of the microbial census.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:686-691.
- Schloss P. D., and Handelsman J. 2005. **Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness.** *Applied and Environmental Microbiology* 71:1501-1506.
- Scott L., McGee P., Minihan D., Sheridan J. J., Earley B., and Leonard N. 2006. **The characterisation of *E. coli* O157:H7 isolates from cattle faeces and feedlot environment using PFGE.** *Veterinary Microbiology* 114:331-336.
- Skandamis P. N., Stopforth J. D., Ashton L. V., Geornaras I., Kendall P. A., and Sofos J. N. 2009. ***Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions.** *Food Microbiology* 26:112-119.
- Šmajš D., Šmarda J., and Weinstock G. M. 2003. **The *Escherichia fergusonii* iucABCD iutA genes are located within a larger chromosomal region similar to pathogenicity islands.** *Folia Microbiologica* 48:139-147.
- Srinivasan V., Nam H. M., Sawant A. A., Headrick S. I., Nguyen L. T., and Oliver S. P. 2008. **Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils.** *Microbial Ecology* 55:184-193.

- Stewart S. L., Grinshpun S. A., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V., and Donnely J. 1995. **Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface.** *Applied and Environmental Microbiology* 61:1232-1239.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J. J., Gibson G. R., Collins M. D., and Doré J. 1999. **Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut.** *Applied and Environmental Microbiology* 65:4799-4807.
- Tang X., Flint S. H., Brooks J. D., Bennett R. J. 2009. **Factors affecting the attachment of micro-organisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis membranes in dairy processing plants.** *Journal of Applied Microbiology* 107:443-51.
- Tibayrenc, M. 2005. Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *TRENDS in Microbiology*. 13:575-580.
- Trevena W. B., Willshaw G. A., Cheasty T., Wray C., and Gallagher J. 1996. **Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection associated with farms.** *The Lancet* 347:60-67.
- Tringe S. G. and Hugenholtz P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 11:442-446.
- Urdahl A. M., Strachan N.J.C., Wasteson Y., MacRae M., and Ogden I.D. 2008. **Diversity of *Escherichia coli* O157 in a longitudinal farm study using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis.** *Journal of Applied Microbiology* 105:1344-1353.
- Van Kessel J. S., Karns J. S., Gorski L., McCluskey B. J., and Perdue M. L. 2004. **Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies.** *Journal of Dairy Science* 87:2822-2830.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., and Swings J. 1996. **Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.** *Microbiological Reviews* 60:407-438.

- von Seidlein L., Kim D. R., Ali M., Lee H., Wang X., Thiem V. D., Canh do G., Chaicumpa W., Agtini M. D., Hossain A., Bhutta Z. A., Mason C., Sethabutr O., Talukder K., Nair G. B., Deen J. L., Kotloff K., and Clemens J. 2006. **A multicentre study of *Shigella diarrhoea* in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology.** *PLoS Medicine* 3:353.
- Wang M., Ahrné S., Jeppsson B., and Molin G. 2005. **Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes.** *FEMS Microbiology Ecology* 54:219-231.
- Ward W. R., Hughes J. W., Faull W. B., Cripps P. J., Sutherland J. P., and Sutherst J. E. 2002. **Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds.** *Veterinary Record* 151:199-206.
- Warnick L. D., Kaneene J.B., Ruegg P.L., Wells S. J., Fossler C., Halbert L., and Campbell A. 2003. **Evaluation of herd sampling for *Salmonella* isolation on midwest and northeast U.S. dairy farms.** *Preventive Veterinary Medicine* 60:195-206.
- Watts J. L. 1988. **Etiological agents of bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology* 16:41-66.
- Wilson S. C., Morrow-Tesch J., Straus D. C., Cooley J. D., Wong W. C., Mitlöhner F. M., and McGlone J. J. 2002. **Airborne Microbial Flora in a Cattle Feedlot.** *Applied and Environmental Microbiology* 68:3238-3242.
- Winfield M. D., and Groisman E. A. 2003. **Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*.** *Applied and Environmental Microbiology* 69:3687-3694.
- Wragg P., La Ragione R. M., Best A., Reichela R., Anjum M. F., Mafura M., and Woodward M. J. 2009. **Characterisation of *Escherichia fergusonii* isolates from farm animals using an *Escherichia coli* virulence gene array and tissue culture adherence assays.** *Research in Veterinary Science* 86:27-35.
- Young J. S., Gormley E., and Wellington E. M. H. 2005. **Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil.** *Applied and Environmental Microbiology* 71:1946-1952.



- Zadoks R. N. Â., Griffiths H. M. Â., Munoz M. A. Â., Ahlstrom C. Â., Bennett G. J. Â., Thomas E. Â., and Schukken Y. H. Â. 2011. **Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk.** *Journal of Dairy Science* 94:1045-1051.
- Zagrebneviene G., Jasulaitiene V., Morkunas B., Tarbunas S., and Ladygaite J. 2005. ***Shigella sonnei* outbreak due to consumption of unpasteurised milk curds in Vilnius, Lithuania, 2004.** *Euro Surveillance* 10: pii=2848. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2848> (accesado el 1 de agosto del 2011).
- Zdanowicz M., Shelford J. A., Tucker C. B., Weary D. M., von Keyserlingk M. A. 2004. **Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust.** *Journal of Dairy Science* 87:1694-701.



### V.3 CAPITULO III

## GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF *Escherichia coli* FROM NEIGHBORING SMALL-SCALE DAIRY FARMS

## Genetic Diversity and Population Structure of *Escherichia coli* from Neighboring Small-Scale Dairy Farms

Jesús Andrei Rosales Castillo<sup>1</sup>, Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas<sup>2</sup>, Hugo Álvarez Hernández<sup>1</sup>, Omar Chassin Noria<sup>3</sup>, Alba Irene Varela Murillo<sup>1</sup>, María Guadalupe Zavala Páramo<sup>1</sup>, Horacio Cano Camacho<sup>1</sup>, and Gerardo Vázquez Marrufo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,\* Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma, CP 58893, Tarímbaro, Michoacán, México

<sup>2</sup>División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Dr. Rafael Carrillo Esq. Dr. Salvador González Herrejón, Centro, CP 58000, Morelia, Michoacán, México

<sup>3</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. R 1er Piso, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mújica, S/N. Col. Felicitas del Río, CP 58030, Morelia, Michoacán, México

(Received November 10, 2010 / Accepted April 21, 2011)

The genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolates from small-scale dairy farms were used to assess the ability of *E. coli* to spread within the farm environment and between neighboring farms. A total of 164 *E. coli* isolates were obtained from bovine feces, bedding, cow teats and milk from 6 small-scale dairy farms. Ward's clustering grouped the isolates into 54 different random amplified polymorphic DNA (RAPD) types at 95% similarity, regardless of either the sample type or the farm of isolation. This suggests that RAPD types are shared between bovine feces, bedding, cow teats, and milk. In addition, transmission of RAPD types between the studied farms was suggested by the Ward grouping pattern of the isolates, Nei's and AMOVA population analyses, and genetic landscape shape analysis. For the first time, the latter analytical tool was used to assess the ability of *E. coli* to disseminate between small-scale dairy farms within the same producing region. Although a number of dispersal mechanisms could exist between farms, the genetic landscape shape analysis associated the flow of *E. coli* RAPD types with the movement of forage and milking staff between farms. This study will aid in planning disease prevention strategies and optimizing husbandry practices.

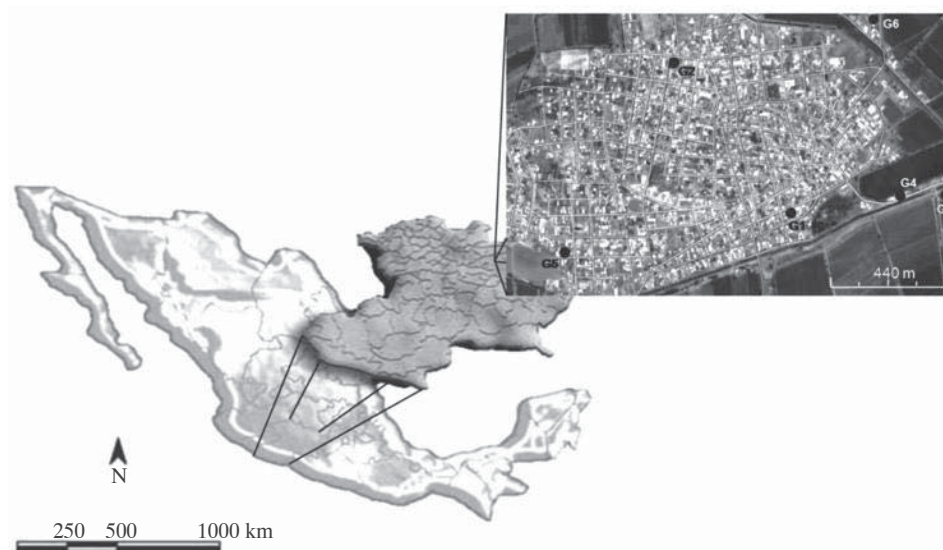
**Keywords:** *Escherichia coli*, small-scale dairy farms, RAPD, population structure, gene flow, genetic landscape shape analysis

*Escherichia coli* is primarily a commensal organism in the digestive tracts of a variety of mammals, including humans (Mariat *et al.*, 2009); however, several strains of *E. coli* cause diverse intestinal and extraintestinal diseases (Kaper *et al.*, 2004). In addition, *E. coli* is one of the bacterial species implicated in bovine mastitis (Hogan and Smith, 2003), a condition resulting in the inflammation of the mammary glands that negatively impacts milk production and profitability of dairy production (Seegers *et al.*, 2003). Knowledge of the persistence of *E. coli* in secondary habitats (soil, feces and bodies of water) within a dairy farm has been restricted to specific pathotypes, in particular, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) (Fremaux *et al.*, 2008); however, farm environments may contain a wide range of potentially pathogenic *E. coli* genotypes (Wenz *et al.*, 2006). Therefore, effective human and bovine disease prevention requires analyzing *E. coli* populations in dairy farm environments as a whole rather than limiting studies to specific pathotypes present in these environments. Bovine feces are one of the main sources of milk contamination in dairy farms (Oliver *et al.*, 2005). Transmission of *E. coli* to humans may occur by direct contact with contaminated feces during the manage-

ment of manure or by the ingestion of milk contaminated during milking or dairy products derived from contaminated milk (McGarvey *et al.*, 2004). A genetic characterization of *E. coli* strains isolated from dairy farms and an evaluation of their ability to spread are essential for the sanitary risk assessment of bovine mastitis and human diarrheic outbreaks (Jayarao *et al.*, 2006). This type of analysis is particularly relevant to small-scale farms in developing countries because locally consumed milk presents a high sanitary risk. Milk from small-scale farms in developing countries may contain pathogenic bacteria because it is often extracted and sold unrefrigerated; raw milk is also used for cheese production (Oliver *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2009). In addition, the risk to public health is increased in developing countries by the low level of applied technology and by poor management practices on small-scale dairy farms (Kivaria *et al.*, 2006; Lakew *et al.*, 2009).

The presence of the same genotype of *E. coli* has been noted in different ecological niches or environmental samples from dairy farms (e.g., Schouten *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Wetzel and LeJeune, 2006; Fremaux *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2009). These studies identified genotypes and their relative frequencies in different environments, within and between farms, and were primarily based on cluster analyses. Genetic landscape shape analysis (Manel *et al.*, 2003) is commonly

\* For correspondence. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx; Tel. and Fax: +52-443-295-8029



**Fig. 1.** Locations of the studied small-scale dairy farms. The location of the state of Michoacán in Mexico is shown. The image to the right shows an aerial view of Tézaro and Cotzio with the locations of the studied farms (Image from Google Earth).

used to evaluate gene flow in eukaryotic populations but it has not been used to assess the dispersal of *E. coli* genotypes in dairy farms. Landscape genetics has been defined as an “amalgamation of molecular population genetics and landscape ecology” (Manel *et al.*, 2003) that applies statistics to genetic and geographic variations between individuals. Spatial patterns of genetic structure and possible regions of gene flow continuity and discontinuity can be identified. Landscape genetic analysis has been widely used in studies of eukaryotic ecology, mainly in animals (Miller *et al.*, 2006; Holzman *et al.*, 2009; Kenchington *et al.*, 2009), but it has not been applied to studies of prokaryotic ecology.

The RAPD assay continues to be used to analyze the genetic diversity of *E. coli* strains (Aslam *et al.*, 2003; Vidovic and Korber, 2006; Tristao *et al.*, 2007; Holley *et al.*, 2008) due to its speed, low cost, ease of implementation, and efficient detection of differences throughout the genome (Foxman *et al.*, 2005). RAPD discriminates between *E. coli* isolates as effectively (Aslam *et al.*, 2003) or better (Cagnacci *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008) than pulse field gel electrophoresis (PFGE), which is considered the gold standard for subtyping foodborne bacterial diseases (Foley *et al.*, 2009). RAPD is

also commonly used to assess gene flow between populations using landscape genetics in several eukaryotic species, including algae (Bouza *et al.*, 2006), trees (Colling *et al.*, 2010), amphibians (Bernal *et al.*, 2005), and insects (Rocha *et al.*, 2007). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) data has also been used to assess genetic discontinuities across geographic space by means of a Delaunay triangulation to establish a connectivity network between collection sites of different populations of an amphibian species (Telles *et al.*, 2007).

In this study, we used RAPD to assess the population diversity of *E. coli* strains in samples from small-scale dairy farms within a production region of west-central México. Using Nei’s classical population analysis approach, we also evaluated the dispersal of isolates within the farm environment. Finally, we used genetic landscape shape analysis to evaluate the ability of *E. coli* strains to disseminate between small-scale dairy farms separated by relatively short (< 1.6 km) geographic distances. To the best of our knowledge, this is the first reported use of RAPD markers to evaluate gene flow by means of landscape genetics in bacterial populations from dairy farms.

**Table 1.** Management and husbandry practices at the studied small-scale dairy farms and the relationships between farms

Farm	Management and technological characteristics				Relationships between farms
	Herd size <sup>a</sup>	Milking	Bedding	Frequency of feces removal	
G1	18	Mechanical	Dry feces and forage	Daily	Stores forage for G2 and G6
G2	9	Manual	Dry feces	Annually	Occasionally receives forage from G1
G3	18	Mechanical	Dry feces and forage	Annually	Shares forage with G4 and G6
G4	10	Mechanical	Wood chips and forage	Monthly	Shares milking staff with G3
G5	21	Mechanical	Dry feces and forage	Monthly	Shares milking staff with G6
G6	10	Mechanical	Dry feces and forage	Annually	Shares forage transportation vehicle with G5

<sup>a</sup> Only productive females were counted.

## Materials and Methods

### Farms studied

The study included six small-scale dairy farms (G1 to G6) in the rural communities of T ejaro and Cotzio in the municipality of Tar imbaro in the state of M ichoac an, located in west-central M exico (Fig. 1). The six farms chosen had similar management and husbandry practices, with herds of 9 (G2) to 21 (G5) Holstein milk cows (Table 1). Milking was primarily mechanical and performed twice daily, yielding an average of 168 L/day. The cows were fed corn, sorghum and alfalfa hay. The bedding was mostly a mixture of hay and dry bovine feces. Waste management involved the periodic removal of bovine feces at frequencies ranging from daily to yearly. To analyze the spatial structure of the genetic relationships between isolates by farm of isolation (see below), all farms were georeferenced, and the geographical pairwise distances between all of the farms were measured. The distances between the dairy farms ranged from 208.5 m between farms G3 and G4 to 1543.4 m between farms G3 and G5.

### Sampling and *E. coli* isolation

The point prevalence (multiple farms analyzed at approximately the same time) of *E. coli* was performed by collecting samples on two days of the same week; farms G1, G2, and G3 were sampled on October 22, and the other three farms were sampled on October 24 (2007). Three samples per farm were randomly selected for each sample type (milk, feces, bedding material, and cow teats) from the same day from each farm, and each sample was processed individually. All samples were placed in sterile containers and processed within 24 h after collection. At each farm, 100 ml milk samples were obtained from cow teats in the four quarters of the udders of three different cows, and undiluted 50  l aliquots were used to inoculate solid Luria-Bertani (LB) and MacConkey (MC) media. Three 5 g samples of fresh bovine feces were randomly taken at each farm, from which 1 g was resuspended and homogenized in 10 ml of saline solution (0.9% NaCl) before serial dilutions of the homogenate were made. Solid LB and MC media were inoculated with 50  l aliquots of the 1:100 dilution. For isolates from bedding material, three 5 g samples were taken from each farm and homogenized, then 2 g of each homogenate were resuspended in 20 ml of LB medium, and 50  l of the resulting suspension were used to inoculate solid sorbitol MC medium. Teat samples were obtained by rubbing a sterile cotton swab on the surface of each of the four teats of three cows per herd, and the cotton swabs were used to inoculate individual solid MC plates by the streak technique. For all samples, the inoculated plates were incubated at 37 C for 24 h, and sorbitol-fermenting colonies (small red/pink) with *E. coli* morphology were inoculated on tryptic

soy slants and incubated for 24 h at 37 C before storage at 4 C. A total of 234 well-differentiated colonies were transferred to LB plates, and 164 of these were identified as *E. coli* by phenotypic characterization and conventional biochemical activity assays (Gram, catalase, oxidase, indole, methyl red/Voges-Proskauer, citrate, and urease). The total number of isolates and the *E. coli* isolates obtained by farm and sample type are shown in Table 2.

### Molecular genotyping

Genomic DNA was extracted from the 164 isolated *E. coli* strains by the phenol-chloroform method (Sambrook and Russell, 2001). Isolates were identified by sequencing PCR products obtained under previously described conditions with highly specific primers that targeted the *E. coli* 16S rRNA gene, ECA75F (5'-GGAAGAAGCTTGC TTCTTGCTGAC-3') and ECR619R (5'-AGCCCCGGGGATTCA CATCTGACTTA-3') (Sabat *et al.*, 2000). The amplification products were sequenced in an AbiPrism Genetic Analyzer ABI310 (Applied Biosystems, USA) using the BigDye Terminator Ver. 3.1 kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The obtained sequences (400 bp average length) were compared to sequences in GenBank with the Blastn algorithm. The sequences were submitted to GenBank with the accession numbers GU646040 to GU646203.

For RAPD amplification assays, the primers Ecorapd 1252 5'-GC GGAAATAG-3', Ecorapd1254 5'-CCGCAGCCAA-3', and Ecorapd 1290 5'-GTGGATGCGA-3' (Berg *et al.*, 1994) were used. The total volume of the reaction mix was 25  l, which contained 25 ng DNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM each deoxynucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.5  M each oligonucleotide and 0.5 U *Taq* DNA recombinant polymerase (Invitrogen, USA). The amplification program included one cycle of 5 min at 94 C followed by 40 cycles of 1 min at 94 C, 1 min at 36 C and 2 min at 72 C, with a final extension at 72 C for 7 min. The amplification products were visualized in a 2% agarose gel (Sambrook and Russell, 2001) with a ChemiDoc (Bio-Rad, USA) imaging system using a 1 kb ladder (Invitrogen, USA) as a molecular weight marker. All RAPD amplification assays were carried out at least twice to confirm their reproducibility in our lab.

### Analysis of data

The gels containing the RAPD amplification patterns were analyzed with Quantity One 4.4.1 software (Bio-Rad) following the instructions in the manufacturer's user guide, which allowed for the following: generation of densitometric curves for each lane in the gel, depuration of the background, and overlapping of densitometric curves between lanes for comparison of peak patterns. Once the densitometry analysis was completed, the MATCH function analyzed all of the

**Table 2.** Number of total isolates, *E. coli* isolates and RAPD types obtained by farm and by sample type

Farm	Sample <sup>a</sup>				Total <sup>b</sup>
	Milk	Cow teats	Bedding	Feces	
G1	4/8 (4)	4/12 (4)	6/12 (5)	5/12 (5)	19/44 (11)
G2	5/8 (3)	9/9 (8)	5/10 (4)	9/9 (9)	28/36 (18)
G3	10/10 (9)	10/11 (9)	1/10 (1)	4/8 (3)	25/39 (20)
G4	10/11 (9)	7/10 (3)	10/10 (7)	9/11 (6)	36/42 (21)
G5	8/9 (7)	10/12 (9)	7/10 (4)	4/8 (4)	29/39 (22)
G6	6/6 (6)	8/9 (6)	5/10 (4)	8/9 (6)	27/34 (18)
Total	43/52 (31)	48/63 (34)	34/62 (23)	39/57 (27)	164/234 (54)

<sup>a</sup> Number of *E. coli* isolates/number of total isolates. The corresponding number of RAPD types shown in parentheses.

<sup>b</sup> Because some RAPD types are shared between samples and between farms, the totals differ from the sums of the RAPD types in farms and in sample types.

lanes in the gel to build a binary matrix with values of 1 or 0, indicating band presence or absence, respectively. All bands above 4 kb were removed from this analysis. Before the binary matrix was built, the software allowed the adjustment of the difference in band weight tolerance for identifying bands as being the same. In this study, we adjusted the band weight tolerance to 3%. All of these considerations and the data processing significantly curtail the subjectivity involved in the RAPD analysis to generate reliable band patterns. The resulting binary matrix was used in all of the subsequent analyses.

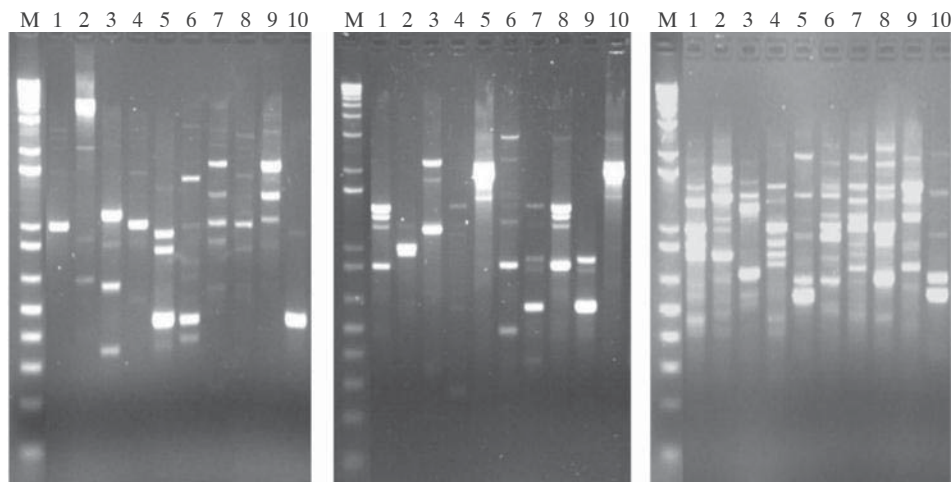
RAPD data were processed by four different analytical criteria to evaluate the genetic diversity of the *E. coli* isolates, establish the relatedness between groups of isolates according to farm provenance, and establish probable strain mobilization patterns (gene flow) between studied farms. In the first approach, all isolates were analyzed without regard to the farm of isolation. In this case, a hierarchical clustering analysis was performed with Ward's method with the PAST version 1.42 software package (Hammer *et al.*, 2001). PAST calculates a Euclidean distance matrix from the original binary matrix and minimizes the increment in the total sum of squares error every time a new group is added to a pre-existing cluster. Major clusters were defined at an 80% similarity level, and strains with a similarity of at least 95% were included in the same RAPD subtype. The numerical index of discrimination, based on the Simpson's index of diversity (Hunter and Gaston, 1988), was used to assess the capacity of the RAPD assay to differentiate *E. coli* isolates. To evaluate the population structure of the studied *E. coli* strains according to farm of provenance and type of sample, the genetic differentiation parameters  $G_{ST}$  and  $\phi_{ST}$  were computed by Nei's standard (1972) approach. The coefficient of genetic differentiation ( $G_{ST}$ ) was estimated for haplotypes using POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). The molecular analysis of variance (AMOVA) was analyzed with GenAlex version 6.0 (Peakall and Smouse, 2006); AMOVA is commonly used to estimate the genetic differentiation among populations when using dominant markers. The software computes the parameter  $\phi_{PT}$  as the proportion of the variance between populations in relation to the total variance according to the equation  $\phi_{PT} = V_{AP} / (V_{AP} + V_{WP})$ , in which  $V_{AP}$  is the between-population variance and  $V_{WP}$  is the within-population variance. The parameter  $f_{PT}$  represents the correlation between individuals within

a population relative to the total and is analogous to  $F_{ST}$  when the analyzed data are binary, as was the case for the RAPD data. To determine the  $G_{ST}$  and  $\phi_{ST}$  values, a sub-population structure by farm of provenance or by sample type was *a priori* assumed, but acceptance or rejection of this assumption depended on the obtained values. Finally, strain mobilization between the studied farms was assessed. The spatial structure of the genetic relationships between the isolates by farm of provenance was visualized with AIS software (Miller, 2005) by generating a 3D graphic representation of the genetic landscape shape, in which the X- and Y-axes represented longitude and latitude in UTM coordinates and the Z- axis represented genetic distance. The analysis with AIS was achieved in three steps: first, genetic distances between all of the individuals were generated by computing a simple allelic similitude index; second, a linear regression of isolation by distance (IBD) was obtained from the previously calculated genetic distances and Euclidean geographical distances for all pairs of individuals; finally, a genetic surface was interpolated using the residuals of the linear regression and a Delaunay triangulation establishing a connectivity network between collection sites. In the present work, a grid size of 50x50 and a weight of distance value of  $\alpha=1.0$  were used.

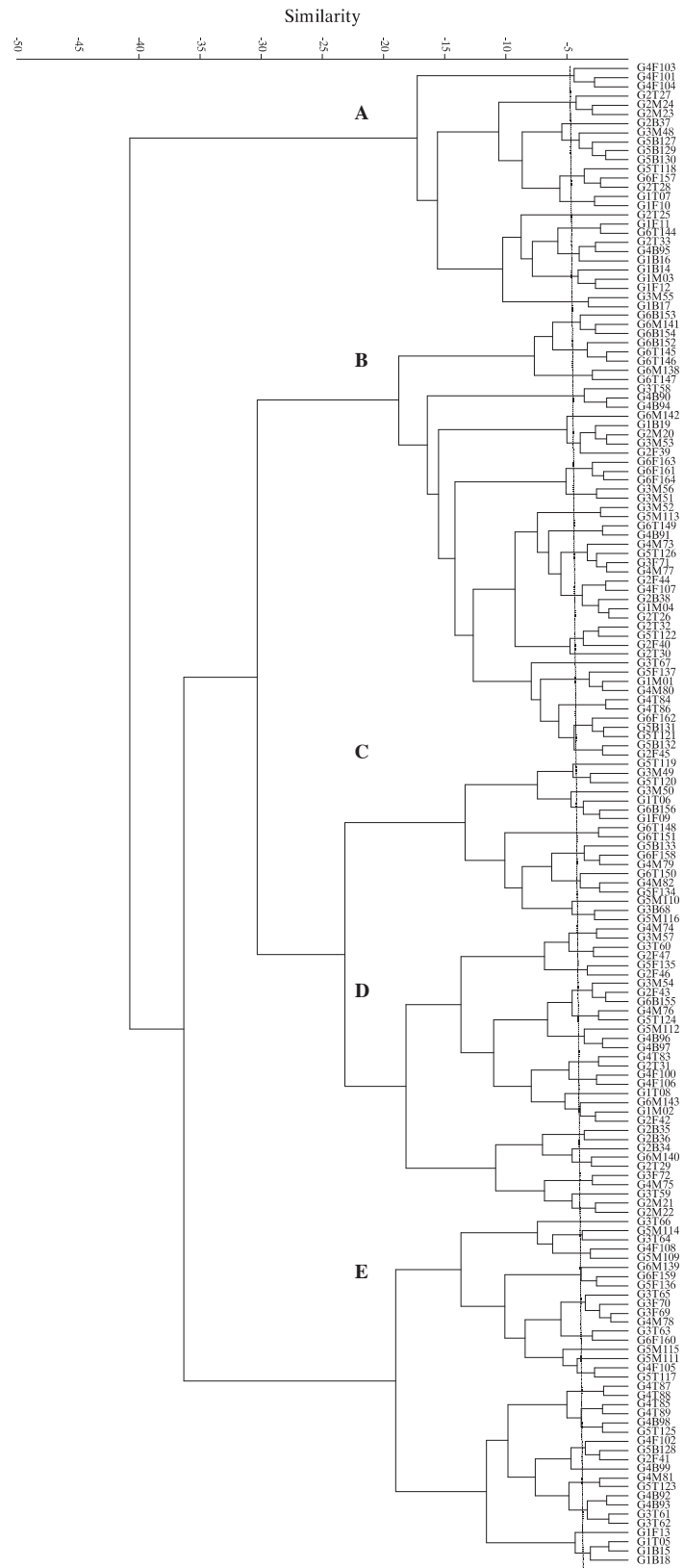
## Results

For all of the isolates studied, partial sequencing (400 bp average length) of the 16S rRNA gene confirmed the species identity previously assigned by conventional microbiological and biochemical protocols. In all cases, Blastn searches in GenBank matched the 16S rRNA gene sequences of different *E. coli* strains with 95% or greater identity and E values ranging from  $e^{-74}$  to 0.0 (data not shown).

RAPD analyses using primer Ecorapd 1252 produced a minimum of one and a maximum of 10 bands per isolate, with sizes ranging from 237 to 6,073 bp. Using primer Ecorapd 1254, up to 11 bands with sizes between 339 and 6,835 bp were observed for some isolates. Finally, primer Ecorapd 1290 generated banding patterns of 1 to 9 bands per isolate, with sizes between 360 and 5,891 bp (Fig. 2). A total of 120



**Fig. 2.** Examples of ethidium bromide-stained agarose (2% w/v) gels showing RAPD profiles obtained from *E. coli* isolates using the primers Ecorapd 1252 (a), Ecorapd 1254 (b), and Ecorapd 1290 (c). Lanes: M, 1 kb plus DNA ladder molecular weight marker (Invitrogen USA); Lanes 1 to 10, banding patterns of isolates G1T6, G1T7, G1T8, G1F9, G1F10, G1F11, G1F12, G1F13, G1B14 and G1B15, respectively.



**Fig. 3.** Clustering of the studied *E. coli* strains by Ward's method using the Euclidean distances calculated from the RAPD patterns generated with the primers Ecorapd 1252, Ecorapd 1254, and Ecorapd 1290. The strains are identified by codes denoting farm of provenance (G1 to G6), type of sample (M, milk; T, cow teats; B, bedding; F, feces), and an identification number. The dashed line represents 95% similarity.



**Table 3.** Unique and shared RAPD *E. coli* types by farm and by sample type

	by farm <sup>a</sup>						by type of sample <sup>b</sup>			
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	M	T	B	F
G1		4	4	3	1	4	M	16	13	17
G2			4	6	6	6	T		12	16
G3				7	8	5	B			9
G4					11	4				
G5						6				
Unique	3	4	2	2	1	4	2	5	2	2

<sup>a</sup> G1 to G6 farms as numbered in Table 1.

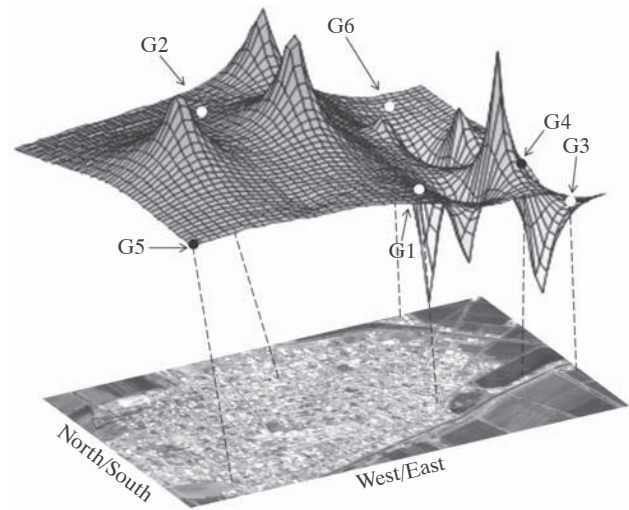
<sup>b</sup> M=Milk, T=cow teats, B=Bedding material; F=Feces.

loci were amplified with the three RAPD primers, which were used to generate a clustering pattern.

The clustering analysis resulted in a dendrogram with five main genetic clusters with a similarity value of 80%, which were further subdivided into subclusters (Fig. 3). Cluster B was the largest and contained 29.8% (49) of the studied strains, while cluster C was the smallest with 10.9% (18) of the strains. Clusters A, D and E included 16.4% (27), 19.5% (32), and 23.2% (38) of the analyzed strains, respectively. The dendrogram did not cluster strains by type of sample or by location. At a similarity level of 95%, 54 RAPD types were discriminated among the 164 analyzed strains (Fig. 3). The numerical index of discrimination (*D*) of the RAPD assay that was calculated for all of the isolated strains was 0.981, indicating that the markers used permitted adequate discrimination between the isolates.

When clustered according to sample type, 31 RAPD types were found in 43 isolates from milk, 34 RAPD types were present in 48 isolates from teats, 23 RAPD types were found in 34 isolates from bedding material, and 27 RAPD types were detected in 39 isolates from feces (Table 2). When clustered according to farm provenance, the farm with the fewest RAPD types (11) was G1; this was also the farm with the fewest isolated strains (19). The largest number of RAPD types (22) was isolated from farm G5 (Table 2).

The analysis of RAPD type distribution by farm of provenance and by sample type showed that 16 RAPD types were exclusive to an individual farm and 11 RAPD types were present in only one of the four types of analyzed samples. Seventy-nine RAPD types were shared between farms, while eighty-



**Fig. 4.** Genetic landscape shape analysis of *E. coli* isolates from the studied dairy farms. The x- and y-axes represent geographic coordinates, and the z-axis represents the genetic distance. Positive value peaks indicate large genetic distances; negative peaks denote areas with high genetic similarity and high gene flow (image from Google Earth).

three were shared between at least two sample types. Because all possible combinations of farm provenance and sample type were considered, the total number of shared RAPD types was greater than 54. Only one RAPD type was common to five of the studied farms, while no RAPD type was common to all six sampled farms. Three RAPD types were present in all of the analyzed sample types. Of the 54 RAPD types found, farms G2 and G6 had four unique RAPD types, the largest number of unique RAPD types found (7.4%). Farm G5 had only one unique RAPD type (Table 3). Farm G5 shared a single RAPD type with farm G1 but 11 with farm G4. With respect to sample type, 17 RAPD types (31.5%) were present both in milk and feces; 16 (29.6%) RAPD types were common to milk and cow teats, while 13 (24.0%) RAPD types were shared between milk and bedding material (Table 3). The sample type with the largest number of unique RAPD types was cow teats, which had five (9.2%), while each of the other sample types had only two (3.7%) unique RAPD types.

**Table 4.** Results of Nei's population analysis of *E. coli* isolates by farm and by type of sample<sup>a</sup>

	$G_{ST}$	d.f.	SS	MS	AMOVA			$\phi_{PT}$	$P^b$
					Variance	% total variance			
By farm									
among farms	0.058	5	92.147	18.429	0.313	3			
within farms		158	1571.219	9.944	9.944	97			
Total		163	1663.366		10.257	100	0.030	0.001	
By sample									
among samples	0.026	3	41.370	13.790	0.090	1			
within samples		160	1621.996	10.137	10.137	99			
Total		163	1663.366		10.227	100	0.009	0.001	

<sup>a</sup>  $G_{ST}$  was calculated with the POPGENE 3.2 software bundle, and the AMOVA was calculated with the GenAlex ver. 6.0 software package. See Materials and Methods for details.

<sup>b</sup>  $P$ , probability of obtaining larger or equal values than those observed based on 9,999 permutations.

The comparison of diversity partition statistics obtained by Nei's classical method shows consistency between the  $G_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  parameters. The value of  $G_{ST}$  between populations (farms) was 0.058, while the AMOVA analysis estimated a  $\Phi_{PT}$  value of 0.030 (Table 4). According to the  $G_{ST}$  determination, 5.7% of the observed diversity was due to between-farm genetic differences, and 94.3% of the measured genetic diversity was due to intra-population genetic variation, i.e., within a particular farm of provenance (Table 4). In the same way, the  $\Phi_{PT}$  value showed that only 3% of the observed variation was due to between-farm variation and 97% of the genetic differences were found within farms.

Further evidence of the mobilization of RAPD types between the studied farms was provided by genetic landscape shape analysis. Examination of the genetic landscape shape clearly revealed two contrasting migration zones. On one side, three main discontinuities of genetic flow between the studied isolates of *E. coli* were observed as three positive value peaks toward the northwest portion of the study area (farms G2, G5, and G6) (Fig. 4). On the other side, three negative value peaks were seen toward the southeast, corresponding to farms G1, G3, and G4 (Fig. 4) and indicating a significant flow of RAPD types between isolates from these farms. However, the second migration area also displayed a positive value peak as a potential barrier for gene flow between farms located in that geographical area.

## Discussion

The presence of common RAPD types among different types of samples is an indicator of the ability of *E. coli* to spread within the dairy farm environment. Clustering of individual isolates failed to discriminate them based on sample type. Thus, our results clearly demonstrate the substantial ability of several RAPD types of *E. coli* to mobilize between several dairy farm environmental compartments. Because milk samples had only two unique RAPD types (3.7% of the total) and shared 17 RAPD types (31.5%) with feces and 13 (24.0%) with bedding material, the source of milk contamination under the conditions studied here is clearly bedding material and ovine feces. Our results contrast with those of Kagkli *et al.* (2007a), who did not find *E. coli* strains derived from bovine feces in milk, and also with those of Son *et al.* (2009), who found that few genotypes were shared by milk, compost, and bovine feces. Most of the isolates from milk in these two studies had unique genotypes, suggesting other sources of contamination. However, our data are in agreement with a diverse array of studies in which bovine feces were reported to be the main source of milk contamination by *E. coli* (Oliver *et al.*, 2005), which can mainly be attributed to deficient production practices and poor hygiene in the dairy farm environment (Oliver *et al.*, 2005, 2009).

We found a significantly low percentage of sample-specific RAPD types, indicating that different RAPD types mobilize between the different sample types analyzed. Interestingly, 9 RAPD types were shared between bedding material and bovine feces, which agrees with the data reported by Son *et al.* (2009) in which only 11 of the 130 analyzed isolates had the same genotypes in compost and fresh bovine feces. This reflects a change in the composition of the *E. coli* population in both

types of sample. Although the bedding material may contain a large proportion of bovine feces mixed with other materials, our results show that not all of the RAPD types initially present in the bovine feces are capable of enduring once they are incorporated into the bedding material. Because udders are in frequent contact with the bedding material, we investigated whether the RAPD types present on cow teats were also present in feces and in bedding material. *E. coli* genotypes that are common in feces and on cow teats but are absent from milk have been identified previously (Gelsomino *et al.*, 2001; Kagkli *et al.*, 2007a, 2007b). While Kagkli *et al.* (2007b) recognized that cow teats are contaminated by contact with bedding material, management by appropriate husbandry practices could prevent the milk from becoming contaminated. In contrast with these results, we found 16 RAPD types that were shared between bedding material, milk and teats, 13 that were shared between milk and bedding, and 17 that were common to milk and feces. In addition, some RAPD types were common to all four samples (data not shown). These results indicate that a primary route by which *E. coli* strains can contaminate milk is from feces to bedding material and finally to cow teats. Such a contamination pathway could easily be avoided by cleaning cow teats prior to milking, which is evidently not a part of current husbandry practices.

*E. coli* populations in dairy farm environments have previously been characterized with similar numbers of isolates (Vidovic and Korber, 2006) or even fewer (Stanford *et al.*, 2005; Wetzels and LeJeune, 2006) than the 164 isolates used in our study. Son *et al.* (2009) found 155 genotypes in 570 studied commensal strains of *E. coli*, and Holley *et al.* (2008) found 209 genotypes from a total of 796 such strains, which were analyzed from different years and sample types. Vidovic and Korber (2006) isolated 194 strains of the O157:H7 serotype and identified 39 genotypes that grouped into three main clusters. The above-mentioned studies differ from the present study with respect to the isolation methods, the types of samples analyzed, the markers used, the number of analyzed isolates and the threshold values for defining the number of genotypes. Despite these differences, in all of these studies, the ratio of genotypes (PFGE profiles or RAPD types) to the total number of analyzed strains fell within a relatively narrow range, 0.21-0.27.

Despite differences in the types of markers used, the geographic scale sampled and, in some cases, the mathematical methods applied for the data analysis, our values from Nei's population analysis were in close agreement with previous reports. On a broad geographic scale, initial studies of genetic differentiation between *E. coli* populations were performed using multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), which showed that the mean value of  $G_{ST}$  between the Australian, Mexican, and ECOR strain collections was 0.047 (Souza *et al.*, 1999). On an intermediate geographic scale, an analysis of *E. coli* isolates from several Australian mammals revealed a  $\Phi_{PT}$  value of 0.045 (Gordon and Lee, 1999). On a finer geographical scale, a more recent study that used a combination of DNA markers with MLEE to study isolates from freshwater beaches found a  $G_{ST}$  value of 0.011 (Walk *et al.*, 2007). The values of  $G_{ST}$  were low for all of these studies, including the present study. The values of  $G_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  that we obtained, 0.058 and 0.030, show that the greatest diversity was observed within



farms rather than between farms.  $G_{ST}$  and  $\phi_{PT}$  values for the sample types were even lower, clearly suggesting a constant flow of RAPD types between sample types and between farms and, as a consequence, a lack of division of farms and sample types into subpopulations.

Seemingly identical genotypes of *E. coli* O157:H7 have been found in different bovine farms globally (Davis *et al.*, 2003), at a regional scale in farms separated by a few hundred kilometers (Rice *et al.*, 1999; Van Donkersgoed *et al.*, 2001; Vidovic and Korber, 2006) and at distances of less than 100 km between studied farms (Rice *et al.*, 1999; Stanford *et al.*, 2005; Vidovic and Korber, 2006; Wetzel and LeJeune, 2006). The number of unique RAPD types varied among the farms in our study, which was performed on a further restricted geographical scale in which the maximum separation between the sampled farms was approximately 1.5 km. Each farm shared a different number of RAPD types with the remaining farms, and a variety of genotypes was found within each farm. This heterogeneous pattern of genotype distribution has been observed previously for *E. coli* O157:H7 in bovine farms separated by longer distances than those evaluated here (Stanford *et al.*, 2005; Vidovic and Korber, 2006; Wetzel and LeJeune, 2006). Based on these previous studies, the sharing of genotypes between farms when samples are taken over a short period of time is considered evidence of the dissemination ability of these genotypes within the studied geographic area, and the presence of a large variety of genotypes within the same farm has been associated with the continuous arrival of new genotypes (Rice *et al.*, 1999).

The recorded dispersion vectors of *E. coli* O157:H7 include birds (Wallace *et al.*, 1997; Shere *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2004), other wild and domestic animals (Rice *et al.*, 1995; Shere *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2004), and domestic flies (Rahn *et al.*, 1997). Because of the proximities of the studied dairy farms, the above-mentioned vectors likely have a dominant role in the exchange of *E. coli* strains within and between the studied farms. Other factors that are associated with the dissemination of *E. coli* on dairy farms are the movement of people (Davis *et al.*, 2003; Wetzel and LeJeune, 2006) and forage (Fairbrother and Nadeau, 2006), which should also be taken into consideration in the studied farms. *E. coli* strains may be disseminated between farms G1 and G6 through forage because both farms store their forage stock in the same storehouse. Farms G5 and G6 share a forage transportation vehicle, while farms G3 and G4 share the same milking staff, where transmission by human contact is most likely. *E. coli* isolates would have to be obtained from the milking staff members and from forage to corroborate these dispersal mechanisms. However, the results obtained from both the clustering patterns by farm and the genetic landscape shape analysis support the possibility of the above-mentioned dispersal mechanisms.

The present work incorporated population genetic tools to analyze *E. coli* isolates from dairy farms. One of these tools was Nei's approach for determining  $G_{ST}$  and  $\phi_{PT}$ , as discussed above. Another tool was genetic landscape shape analysis, which explicitly quantifies the effects of landscape composition, configuration and matrix quality on gene flow and spatial genetic variation (Storfer *et al.*, 2007). With respect to the epidemiological applications of this latter tool, it has recently

been proposed that it should be defined in a broader context including "spatially implicit studies as well as phylogeographic approaches", in which *landscape* is interpreted as a "heterogeneous space that can influence microevolutionary processes in parasite populations across scales, from within individual hosts to global species distributions (Biek and Real 2010)."

The application of genetic landscape shape analysis to molecular epidemiology is still just beginning (Biek and Real, 2010); the published studies of bacterial populations are limited, representing about 3% (5 papers) of the 174 analyzed publications on genetic landscape analysis between 1998 and 2008 (Storfer *et al.*, 2010). In the present study, given the pathogenic potential of certain strains of *E. coli* for humans and cattle, genetic landscape shape analysis has contributed to a study of public health and contagious infectious diseases, which are related to epidemiology.

The results of the genetic landscape shape analysis partially agreed with the observed relationships between farms with respect to forage transportation and storage and the mobility of the milking staff. For example, genetic landscape shape analysis indicated the existence of gene flow between farms G1-G6, which shared forage storage, and between farms G3-G4, which shared milking staff. Additionally, genetic landscape shape analysis showed barriers to the exchange of RAPD types between farms G2-G6, which did not share forage or milking staff. Not all of the RAPD type exchanges can be explained by forage and milking staff mobility, and other dispersion vectors need to be evaluated in the future to arrive at more robust conclusions. Genetic landscape shape analysis was also congruent with the values of  $G_{ST}$  and  $\phi_{PT}$ , revealing that there was no genetic differentiation between *E. coli* isolates according to farm of provenance, which is indicative of exchange of RAPD types between farms.

Although genetic landscape shape analysis aims to correlate gene flow with physical aspects such as rivers, mountains, and roads, the present work indicates that, in the small-scale dairy farms studied, gene flow may also be correlated with socioeconomic factors in the production system. The role of these factors is particularly evident in the results of the genetic landscape shape analysis from farms G1-G6. Although these farms are further away from one another and are separated by a large stretch of houses and roads, these farms shared RAPD types and showed evidence of gene flow associated with the mobility of farm staff and forage. Given the above socioeconomic aspect, the present work contributes a new application of genetic landscape shape analysis to public health issues in dairy farms, in which this tool may contribute to an understanding of the dispersion patterns of pathogenic bacteria within a dairy-producing region and aid in the identification of physical (landscape features), environmental (e.g., temperature and humidity), biological (e.g., birds and insects) or socioeconomic (cattle exchange, people, and forage flow) factors that favor or hamper pathogen dispersion on various geographic scales.

Genetic landscape shape analysis at a wider geographic range should better resolve gene flow patterns. This knowledge would aid in planning and implementing measures to prevent the dissemination of pathogenic bacteria such as *E. coli* between and within dairy farms, thus reducing the risk of transmission and disease surges and improving management and husbandry

practices.

## Acknowledgements

This work was possible thanks to the financial support of the Programa de Investigación 2009 granted by CIC-UMSNH. J.A. Rosales-Castillo acknowledges a scholarship from CONACYT for the completion of his doctoral thesis. We are indebted to Edith Higareda and Stuart Reichler for critically reading and correcting the English of the manuscript. Our deepest acknowledgements are due to the dairy producers in Téjaro and Cotzio for their collaboration and for making it possible to work on their farms.

## References

- Aslam, M., F. Nattress, G. Greer, C. Yost, C. Gill, and L. McMullen. 2003. Origin of contamination and genetic diversity of *Escherichia coli* in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2794-2799.
- Berg, D.E., N.S. Akopyants, and D. Kersulyte. 1994. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5, 13-24.
- Bernal, X.E., C. Guarnizo, and H. Lüddecke. 2005. Geographic variation in advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura, Dendrobatidae) from the Colombian Andes. *Herpetologica* 61, 395-408.
- Biek, R. and L.A. Real. 2010. The landscape genetics of infectious disease emergence and spread. *Microb. Ecol.* 19, 3515-3531.
- Bouza, N., J. Caujapé-Castells, M.A. González-Pérez, and P.A. Sosa. 2006. Genetic structure of natural populations in the red algae *Gelidium canariense* (Gelidiales, Rhodophyta) investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Phycol.* 42, 304-311.
- Cagnacci, S., L. Gualco, E. Debbia, G.C. Schito, and A. Marchese. 2008. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25:H4-ST 131 and O15:K52:H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2605-2612.
- Cho, S., F. Diez-Gonzalez, C.P. Fossler, S.J. Wells, C.W. Hedberg, J.B. Kaneene, P.L. Ruegg, L.D. Warnick, and J.B. Bender. 2006. Prevalence of shiga toxin-encoding bacteria and shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from dairy farms and county fairs. *Vet. Microbiol.* 118, 289-298.
- Colling, G., P. Hemmer, A. Bonniot, S. Hermant, and D. Matthies. 2010. Population genetic structure of wild daffodils (*Narcissus pseudonarcissus* L.) at different spatial scales. *Plant Syst. Evol.* 287, 99-111.
- Davis, M.A., D.D. Hancock, T.E. Besser, D.H. Rice, C.J. Hovde, R. Digiacomo, M. Samadpour, and D.R. Call. 2003. Correlation between geographic distance and genetic similarity in an international collection of bovine fecal *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Epidemiol. Infect.* 131, 923-930.
- Fairbrother, J.M. and E. Nadeau. 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev. Sci. Tech.* 25, 555-569.
- Foley, S.L., A.M. Lynne, and R. Nayak. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9, 430-440.
- Foxman, B., L. Zhang, J.S. Koopman, S.D. Manning, and C.F. Marrs. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2, 10.
- Fremaux, B., C. Prigent-Combaret, and C. Vernozy-Rozand. 2008. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Vet. Microbiol.* 132, 1-18.
- Gelsomino, R., M. Vancanneyt, S. Condon, J. Swings, and T.M. Cogan. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 177-188.
- Gordon, D.M. and J. Lee. 1999. The genetic structure of enteric bacteria from Australian mammals. *Microbiology* 145, 2673-2682.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper, and P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). Accessed 20 April 2010.
- Hogan, J. and K.L. Smith. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34, 507-519.
- Holley, R., J. Walkty, G. Blank, M. Tenuta, K. Ominski, D. Krause, and L.K. Ng. 2008. Examination of *Salmonella* and *Escherichia coli* translocation from hog manure to forage, soil, and cattle grazed on the hog manure-treated pasture. *J. Environ. Qual.* 37, 2083-2092.
- Holzman, J.P., A.J. Bohonak, L.R. Kirkendall, D. Gottlieb, A.R. Harari, and S.T. Kelley. 2009. Inbreeding variability and population structure in the invasive haplodiploid palm-seed borer (*Coccytrypes dactyliperda*). *J. Evol. Biol.* 22, 1076-1087.
- Hunter, P.R. and M.A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465-2466.
- Jayarao, B.M., S.C. Donaldson, B.A. Straley, A.A. Sawant, N.V. Hegde, and J.L. Brown. 2006. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 89, 2451-2458.
- Kagkli, D.M., M. Vancanneyt, P. Vandamme, C. Hill, and T.M. Cogan. 2007a. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1393-1405.
- Kagkli, D.M., M. Vancanneyt, C. Hill, P. Vandamme, and T.M. Cogan. 2007b. Enterococcus and Lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 243-251.
- Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123-140.
- Kennington, E.L., G.C. Harding, M.W. Jones, and P.A. Prodohl. 2009. Pleistocene glaciation events shape genetic structure across the range of the American lobster, *Homarus americanus*. *Mol. Ecol.* 18, 1654-1667.
- Kivaria, F.M., J.P. Noordhuizen, and A.M. Kapaga. 2006. Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 185-194.
- Lakew, M., T. Tolosa, and W. Tigre. 2009. Prevalence and major bacterial causes of bovine mastitis in Asella, South Eastern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 1525-1530.
- Machado, E., T.M. Coque, R. Canton, J.C. Sousa, and L. Peixe. 2008. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 296-302.
- Manel, S., M.K. Schwartz, G. Luikart, and P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18, 189-197.
- Mariat, D., O. Firmesse, F. Levenez, V. Guimaraes, H. Sokol, J. Dore, G. Corthier, and J.P. Furet. 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9, 123.
- McGarvey, J.A., W.G. Miller, S. Sanchez, and L. Stanker. 2004. Identification of bacterial populations in dairy wastewaters by use of 16S rRNA gene sequences and other genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4267-4275.
- Miller, M.P. 2005. Alleles in space (AIS): computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Hered.* 96, 722-724.
- Miller, M.P., M.R. Bellinger, E.D. Forsman, and S.M. Haig. 2006. Effects of historical climate change, habitat connectivity, and vicariance on genetic structure and diversity across the range of the

- red tree vole (*Phenacomys longicaudus*) in the Pacific Northwestern United States. *Mol. Ecol.* 15, 145-159.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283-292.
- Nielsen, E.M., M.N. Skov, J.J. Madsen, J. Lodal, J.B. Jespersen, and D.L. Baggesen. 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6944-6947.
- Oliver, S.P., B.M. Jayarao, and R.A. Almeida. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 115-129.
- Oliver, S.P., K.J. Boor, S.C. Murphy, and S.E. Murinda. 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 793-806.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288-295.
- Rahn, K., S.A. Renwick, R.P. Johnson, J.B. Wilson, R.C. Clarke, D. Alves, S. McEwen, H. Lior, and J. Spika. 1997. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiol. Infect.* 119, 251-259.
- Rice, D.H., D.D. Hancock, and T.E. Besser. 1995. Verotoxigenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. *Vet. Rec.* 137, 524.
- Rice, D.H., K.M. McMenamin, L.C. Pritchett, D.D. Hancock, and T.E. Besser. 1999. Genetic subtyping of *Escherichia coli* O157 isolates from 41 Pacific Northwest USA cattle farms. *Epidemiol. Infect.* 122, 479-484.
- Rocha, L.S., A. Falqueto, C.B. dos Santos, G. Grimaldi, Jr., and E. Cupolillo. 2007. Genetic structure of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 559-565.
- Sabat, G., P. Rose, W.J. Hickey, and J.M. Harkin. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 844-849.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 1, 3rd (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y., USA.
- Schouten, J.M., E.A. Graat, K. Frankena, A.W. van de Giessen, W.K. van der Zwaluw, and M.C. de Jong. 2005. A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment. *Vet. Microbiol.* 107, 193-204.
- Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34, 475-491.
- Shere, J.A., K.J. Bartlett, and C.W. Kaspar. 1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1390-1399.
- Son, I., J.A. Van Kessel, and J.S. Karns. 2009. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 837-847.
- Souza, V., M. Rocha, A. Valera, and L.E. Eguiarte. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3373-3385.
- Stanford, K., D. Croy, S.J. Bach, G.L. Wallins, H. Zahiroddini, and T.A. McAllister. 2005. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial dairies in southern Alberta. *J. Dairy Sci.* 88, 4441-4451.
- Storfer, A., M.A. Murphy, J.S. Evans, C.S. Goldberg, S. Robinson, S.F. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling, and L.P. Waits. 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* 98, 128-142.
- Storfer, A., M.A. Murphy, S.F. Spear, R. Holderegger, and L.P. Waits. 2010. Landscape genetics: where are we now? *Mol. Ecol.* 19, 3496-3514.
- Telles, M.P.C., J.A.F. Diniz-Filho, R.P. Bastos, T.N. Soares, L.D. Guimaraes, and L.P. Lima. 2007. Landscape genetics of *Physalae-mus cuvieri* in Brazilian Cerrado: correspondence between population structure and patterns of human occupation and habitat loss. *Biol. Conserv.* 139, 37-46.
- Tristao, L.C., A.G. Gonzalez, C.A. Coutinho, A.M. Cerqueira, M.J. Gomes, K. Irino, B.E. Guth, and J.R. Andrade. 2007. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Vet. Microbiol.* 119, 358-365.
- Van Donkersgoed, J., J. Berg, A. Potter, D. Hancock, T. Besser, D. Rice, J. LeJeune, and S. Klashinsky. 2001. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Can. Vet. J.* 42, 714-720.
- Vidovic, S. and D.R. Korber. 2006. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Saskatchewan cattle: characterization of isolates by using random amplified polymorphic DNA PCR, antibiotic resistance profiles, and pathogenicity determinants. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4347-4355.
- Walk, S.T., E.W. Alm, L.M. Calhoun, J.M. Mladonicky, and T.S. Whittam. 2007. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environ. Microbiol.* 9, 2274-2288.
- Wallace, J.S., T. Cheasty, and K. Jones. 1997. Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* 82, 399-404.
- Wenz, J.R., G.M. Barrington, F.B. Garry, R.P. Ellis, and R.J. Magnuson. 2006. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J. Dairy Sci.* 89, 3408-3412.
- Wetzel, A.N. and J.T. LeJeune. 2006. Clonal dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 subtypes among dairy farms in northeast Ohio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2621-2626.
- Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye, and J.X. Mao. 1999. *POPGENE version 1.31, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

## V.4 CAPITULO IV

### GRUPOS FILOGENÉTICOS, PATOTIPOS Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS DE *Escherichia coli* OBTENIDOS DE GRANJAS LECHERAS DE PRODUCCIÓN A PEQUEÑA ESCALA

#### Resumen

Se analizó la resistencia a antibióticos y la presencia de integrones clase 1 (IC1) en relación con el patotipo y filogrupo de 180 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de material de cama, excretas, leche y ubres de vaca de granjas lecheras de producción a pequeña escala. El 85.55% de las cepas mostraron fenotipos de resistencia al menos a un antibiótico, de éstas el 45.5% fueron multirresistentes (MR). Las cepas MR se encontraron principalmente en ubre (26.82%) y excretas (26.82%). Se encontraron IC1 en 43.88% de las cepas. El 20% de las cepas fueron identificadas como ETEC-LT, 8.88% como ETEC-STa, 3.33% como EPEC, 2.22% como EIEC y 1.66% como ETEC-LT/STa. El 63.88% de las cepas no fue asignado a ningún patotipo. El filogrupo A fue el más abundante con 67.77% y el B1 el menos abundante con 6.11%. Cepas de los patotipos EPEC, ETEC-LT y ETEC-STa y los filogrupos A, B2 y D se encontraron en todos los tipos de muestras analizadas. Solo un 40.24% de cepas MR presentó IC1 y no se encontró relación entre la multirresistencia y algún patotipo o filogrupo en particular. La presencia de patotipos diarreagénicos de *E. coli* en el ambiente, el ganado y la leche de granjas de producción a pequeña escala que presentan MR y portan IC1 implica riesgos de salud pública que deben de ser evaluados para disminuir las probabilidades de diseminación de enfermedades diarreagénicas y la presencia de cepas multiresistentes a antibióticos en la cadena alimenticia.

#### V.4.1 INTRODUCCIÓN

Las cepas comensales y patógenas de *Escherichia coli* se han subdividido en cuatro principales grupos filogenéticos denominados A, B1, B2 y D (Selander *et al.*, 1986; Herzer *et al.*, 1990), lo cuales difieren en su nicho ecológico y su historia evolutiva (Gordon y Cowling, 2003), así como en algunas características fisiológicas como su habilidad para explotar diferentes fuentes de azúcar o sus perfiles de resistencia a antibióticos (Gordon, 2004). Adicionalmente, se ha documentado que las cepas de los filogrupos B2 y D contienen más factores de virulencia que las cepas de los filogrupos A y B1 (Johnson *et al.*, 2001), por lo que las cepas patógenas extraintestinales usualmente se ubican en los primeros (Picard *et al.*, 1999; Johnson y Stell, 2000), mientras que las cepas comensales en los segundos (Bingen *et al.*, 1998). Las cepas patógenas intestinales que afectan al ser humano se han ubicado dentro de los grupos A, B1 y D (Pupo *et al.*, 1997) y se han dividido en cinco patotipos, de acuerdo a los factores de virulencia asociados. Dichos patotipos son el enteroagregativo (EAEC), el enterohemorrágico (EHEC), el enteropatógeno (EPEC), el enteroinvasivo (EIEC) y el enterotoxigénico (ETEC) (Kaper *et al.*, 2004). El patotipo EHEC constituye un subgrupo del patotipo que produce toxina shiga (STEC). *E. coli* también puede ocasionar enfermedades en ganado bovino, ya que se identifica como un agente causal de mastitis bovina (Burvenich *et al.*, 2003; Hogan y Smith, 2003), enfermedad de la glándula mamaria que causa pérdidas económicas cuando afecta al ganado lechero. Mientras que en las afecciones diarreicas humanas están involucradas cepas que expresan factores de específicos virulencia (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004), se ha propuesto que las cepas asociadas a mastitis bovina no parecen presentar factores específicos de virulencia (Burvenich *et al.*, 2003), aunque es algo que está en discusión (Shpigel, *et al.*, 2008). El ganado bovino puede ser portador asintomático de cepas diarreagencias de *E. coli* (Oliver *et al.*, 2005) y el ambiente de las granjas lecheras funciona como reservorio, en el cual pueden sobrevivir diversos genotipos y patotipos de dicha especie (Fremaux *et al.*, 2006; Wenz *et al.*, 2006; Fremaux *et al.*, 2008;), desde donde se pueden diseminar incrementando el riesgo de aparición de brotes. Todo esto resalta la importancia de mantener programas de monitoreo en granjas lecheras con la finalidad de evitar la



contaminación de la leche y la emergencia de brotes de enfermedades en el ganado o en el hombre.

La mayoría de los reportes sobre patotipos de *E. coli* en granjas lecheras se enfocan en la detección y el monitoreo de STEC y en particular al serotipo O157:H7, debido a la importancia en salud pública que este tiene en países desarrollados (Armstrong *et al.*, 1996; Murinda *et al.*, 2002). No obstante, en países en vías de desarrollo el patotipo STEC no tiene la misma relevancia epidemiológica que en países desarrollados. Así, uno de los patotipos de *E. coli* más comúnmente asociados a enfermedades diarreicas en países en vías de desarrollo es el ETEC (Qadri *et al.*, 2005; Fischer-Walker *et al.*, 2010) el cual no tiene la misma incidencia en países desarrollados (Rocourt *et al.*, 2003; Fischer-Walker *et al.*, 2010; Scallan *et al.*, 2011). En particular, los principales patotipos de *E. coli* asociados a procesos diarreicos en México son EPEC, ETEC y EIEC (Bouckenooghe *et al.*, 2002; Paniagua *et al.*, 2007; Estrada-García *et al.*, 2009), siendo significativamente bajos los casos asociados a STEC y ningún caso específicamente asociado al serotipo O157:H7 (Flisser *et al.*, 2002).

En las granjas de producción lechera alrededor del mundo es común el uso de antibióticos como terapéuticos, profilácticos y para promover el crecimiento del ganado, lo cual incrementa el riesgo de diseminación de poblaciones bacterianas resistentes (Call *et al.*, 2008; Sarmah *et al.*, 2006). Se ha documentado el papel del ambiente de las granjas lecheras como reservorio de *E. coli* portadora de genes de resistencia múltiple a antibióticos, la cual puede jugar un importante papel en la diseminación de estos genes a otras bacterias comensales y patógenas (Burgos *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2007). Estos genes de resistencia frecuentemente se encuentran en elementos genéticos móviles llamados integrones, los cuales son sistemas de captura y expresión de genes caracterizados por la presencia de un gen *intl* que codifica una integrasa, un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor (Ploy *et al.*, 2000; Cambray *et al.*, 2010). A la fecha se han descrito cinco clases de integrones con base en la identidad de las integrasas que codifican, y en todas están presentes determinantes de resistencia a antibióticos, pero solo las tres primeras han sido asociadas a la propagación de fenotipos de multiresistencia (Cambray *et al.*,

2010). Los integrones clase 2 comúnmente portan una mutación que genera una integrasa no funcional, mientras que los integrones clase 3 tienen una distribución limitada. Los integrones de las clases 4 y 5 se encuentran asociados con resistencia a trimetropín y ha sido reportados únicamente en especies del género *Vibrio*. Los integrones de clase 1 son los más ampliamente distribuidos y los de mayor relevancia clínica, ya que juegan un papel importante en la diseminación de genes de resistencia antibióticos en bacterias Gram negativas y están comúnmente asociados a miembros de la familia Enterobacteriaceae (Fluit y Schmitz, 1999; Peters *et al.*, 2001). El hecho de que los integrones clase 1 puedan ser movilizados mediante plásmidos conjugativos permite su transmisión entre cepas bacterianas de la misma o diferente especie (Cambray *et al.*, 2010).

No solo los factores de resistencia pueden ser transferidos entre cepas bacterianas. Ciertos factores de virulencia pueden mobilizarse mediante elementos genéticos y ser transferidos a cepas comensales normales resistentes a antibióticos mediante intercambio genético horizontal (Reid *et al.*, 2000; Wirth *et al.*, 2006). Las bacterias resistentes pueden ser transferidas directamente del ganado a humanos (Price *et al.*, 2007; Van den Bogaard y Stobberingh, 2000) o pueden entrar a la cadena alimenticia y consecuentemente ser transferidas a humanos (Schwarz *et al.*, 2001).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue realizar una caracterización de cepas de *E. coli* obtenidas de distintas muestras de granjas lecheras de producción a pequeña escala, analizando la presencia de patotipos diarreagénicos, la distribución de grupos filogenéticos, los patrones de susceptibilidad a antibióticos y la distribución de integrones clase 1.

#### **V.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **Obtención de los aislados de *Escherichia coli***

Se analizó un total de 180 cepas de *Escherichia coli* obtenidas de muestras de leche, ubre, material de cama y excretas provenientes de granjas de traspatio del municipio de Tarímbaro Mich. Los detalles del muestreo, aislamiento y caracterización de 164 de cepas analizadas han sido descritos con anterioridad

(Rosales-Castillo *et al.*, en prensa, Capítulo III). A este grupo de cepas se agregaron para el presente trabajo, 16 cepas obtenidas de 2 granjas adicionales en la misma área de estudio y por los mismos métodos de muestreo y técnicas de aislamiento previamente descritas.

### **Determinación de susceptibilidad a antimicrobianos**

La resistencia a antibióticos fue determinada por el método de difusión por disco (o método de Kirby-Bauer) usando multidiscos antimicrobianos comerciales (Multidiscos Gram negativos, BIO-RAD, USA) de acuerdo a los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Los multidiscos usados en el estudio contienen: Amikacina (AK), 30 µg; Ampicilina (AMP), 10 µg; Carbenicilina (CB), 100 µg; Cefalotina (CF), 30 µg; Cefotaxima (CTX), 30 µg; Ceftriaxona (CRO), 30 µg; Cloranfenicol (CL), 30 µg; Gentamicina (GE), 10 µg; Netilmicina (NET), 30 µg; Nitrofurantoina (NF), 300 µg; Pefloxacina (PEF), 5 µg y Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT), 25 µg. Se definió como cepa multirresistente aquella que presentó resistencia a 3 ó más antibióticos de distintos grupos.

### **Detección de integrones clase 1**

Se aisló ADN genómico de las cepas de interés por el método estándar de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). La presencia de integrones de clase 1 fue evaluada mediante un ensayo de PCR empleando los iniciadores 5CS (5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3') y 3CS (5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3') dirigidos a los segmentos conservados de integrones clase 1 (Ahmed *et al.*, 2007). El protocolo de amplificación inició con un paso de desnaturalización a 94 °C por 5 min seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min, finalmente se realizó una extensión a 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2.0% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001).



## **Determinación de filogrupos**

Los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D fueron determinados por el método de PCR triplex (Clermont *et al.*, 2000) con los iniciadores ChuA.1, ChuA.2, YjaA.1, YjaA.2, TspE4C2.1y TspE4C2.2 dirigidos a los genes *chuA* y *yjaA* y el fragmento de DNA TspE4.C2, respectivamente. La reacción de PCR consistió de una desnaturalización inicial por 5 min a 94 °C y 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C seguida por una extensión final por 7 min a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2.0% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). Las cepas fueron asignadas a los grupos filogenéticos A (*chuA*<sup>-</sup>, TspE4.C2<sup>-</sup>), B1 (*chuA*<sup>-</sup>, TspE4.C2<sup>+</sup>), B2 (*chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>+</sup>) o D (*chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>), de acuerdo a Clermont *et al.* (2000).

Para incrementar la discriminación de las cepas, subgrupos o filotipos fueron determinados como sigue: subgrupo A<sub>0</sub> (grupo A), *chuA*<sup>-</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>, TspE4.C2<sup>-</sup>; subgrupo A<sub>1</sub> (grupo A), *chuA*<sup>-</sup>, *yjaA*<sup>+</sup> TspE4.C2<sup>-</sup>; grupo B1, *chuA*<sup>-</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>, TspE4.C2<sup>+</sup>; subgrupo B2<sub>2</sub> (grupo B2), *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>+</sup>, TspE4.C2<sup>-</sup>; subgrupo B2<sub>3</sub> (grupo B2), *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>+</sup>, TspE4.C2<sup>+</sup>; subgrupo D<sub>1</sub> (grupo D), *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>, TspE4.C2<sup>-</sup> y subgrupo D<sub>2</sub> (grupo D), *chuA*<sup>+</sup>, *yjaA*<sup>-</sup>, TspE4.C2<sup>+</sup> (Escobar-Páramo *et al.*, 2006).

## **Detección de patotipos de *E. coli* diarreagenica**

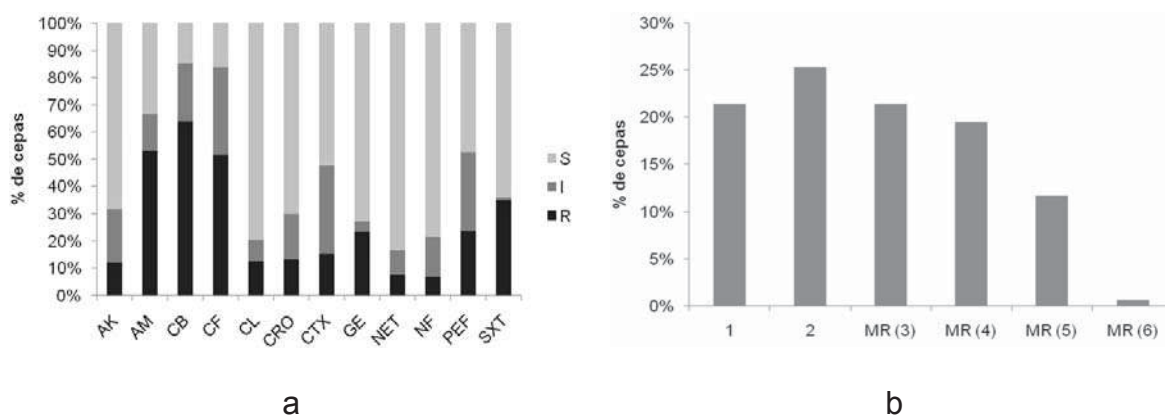
La identificación de los patotipos diarreagénicos se realizó mediante ensayos de PCR empleando iniciadores específicos para el gen *bfp* en el caso de *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *ipaH* para *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), y LT (toxina termolábil) y STa (toxina termoestable a) para *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Tornieporth *et al.*, 1995). Como referencia se emplearon las cepas de *E. coli*, H10407 (ETEC-LT), 25611 (ETEC-ST), O111 (EPEC) y E11 (EIEC), proporcionadas por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica de México (INDRE).

## **V.4.3 RESULTADOS**

### **Resistencia a antibióticos de los aislados de estudio**

En los ensayos de susceptibilidad a antibióticos, 154 (85.55%) cepas mostraron fenotipos de resistencia por lo menos a un antibiótico, siendo la mayoría

resistentes a CB (63.88%) y AMP (53.33%) y sensibles a NET (83.33%) y CL (79.44%) (Fig. 1a). Independientemente de la muestra de procedencia, la mayoría de las cepas fueron resistentes a CB, con 60.41% para leche, 61.22% para ubre, 69.23% para material de cama y 65.90% para excretas. De las 154 cepas resistentes 33 (21.42%) mostraron resistencia a un grupo de antibióticos, 39 (25.32%) cepas a dos grupos de antibióticos; las 82 (45.5%) cepas restantes mostraron resistencia a 3 o más grupos de antibióticos, considerándose multiresistentes (MR) (Fig. 1b). En particular, una de las cepas presentó multirresistencia a 6 grupos de antibióticos de los 7 probados. La mayoría (53.64%) de las cepas MR provenían de ubre (26.82%) y de excretas (26.82%), aportando la leche y el material de cama el 46.34% restante (23.17% c/u).

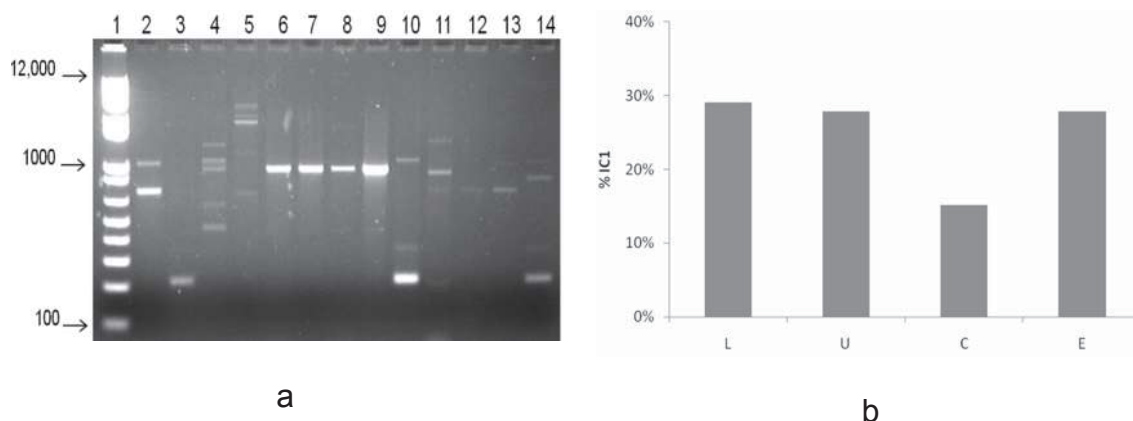


**Figura 1. Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* estudiadas.** a) Porcentaje de cepas resistentes a los antibióticos usados; b) Porcentaje de cepas resistente a 1 o más grupos de antibióticos. Entre paréntesis se muestra el número de grupos de antibióticos a los que se presentó resistencia.

### DetECCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE INTEGRONES CLASE 1

Al analizar las cepas en busca de integrones clase 1 (IC1) se observó que 79 (43.88%) cepas portan IC1 y las 101 cepas restantes no presentaron ningún amplicón. El 51.89% de cepas que mostraron una amplificación positiva presentaron bandas únicas que oscilaron entre 200 y 900 pb. Esto sugiere que los integrones presentes en dichas cepas han incorporado distinto número de casetes de resistencia. Otras 38 cepas mostraron patrones de bandeo múltiple, aun cuando la

temperatura de alineamiento del ensayo de PCR se aumentaba para eliminar la generación de productos de amplificación no específicos. En estas cepas se obtuvieron entre dos y seis bandas de amplificación, de tamaños que oscilaron entre los 200 y los 5000 pb (Fig. 2a). De las cepas que mostraron la presencia de integrones clase 1, 23 (47.91%) fueron aisladas de leche, mientras que 22 (44.89%) de ubre, 12 (30.76%) de material de cama y 22 (50%) de excretas (Fig. 2b).



**Figura 2. Detección y frecuencia de integrones clase 1 en las cepas de *E. coli* estudiadas.** a) Gel de agarosa al 2.0% teñido con bromuro de etido que muestra ejemplos de los patrones de amplificación obtenidos en las cepas de *E. coli* portadoras de integrones. Carriles: 1, Marcador de peso molecular (1 kb plus DNA ladder, Invitrogen USA); carriles 2 a 14, patrones de amplificación de los aislados G1L3, G1TU8, G1E9, G1C14, G1C15, G1C16, G1C17, G7L165, G7L166, G7U168, G7E169, G8L174 y G8C180, respectivamente; b) Frecuencia de cepas portadoras de IC1 por muestra de procedencia (L, leche; U, ubre; C, material de cama; E, excretas).

### Detección y distribución de patotipos diarreagénicos

De las 180 cepas estudiadas 36 (20%) fueron identificadas como ETEC-LT, 16 (8.88%) como ETEC-STa, 6 (3.33%) como EPEC, 4 (2.22%) como EIEC y 3 (1.66%) como ETEC-LT/Sta. Las 115 (63.88%) restantes no fueron asignadas a ningún patotipo (tabla 1). El patotipo más abundante en todos los tipos de muestra fue ETEC-LT, mientras que los patotipos EPEC y ETEC con sus dos variables LT y STa fueron encontrados en muestras de leche, en tanto que en excretas y material de cama se encontró a todos los patotipos.

**Tabla 1.** Prevalencia de patotipos diarreagénicos de los aislados de *E. coli* en relación a subfilogrupos, muestra de procedencia y presencia de integrones clase 1.

Patotipos (número de cepas)	Subfilogrupo							Muestra <sup>1</sup>				IC1 <sup>2</sup>
	A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	B1	B2 <sub>2</sub>	B2 <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	L	U	S	E	
EPEC (n=6)	3	2				1		1	2	2	1	1
EIEC (n=4)	2		1	1					1	2	1	
ETEC-LT (n=36)	17	6	2	4		6	1	7	8	10	11	11
ETEC-STa (n=16)	9	3		3			1	5	6	3	2	8
ETEC-LT/STa (n=3)	1	2								1	2	1
NA <sup>2</sup> (n=115)	49	28	8	5		23	2	35	32	21	27	58
Total	81	41	11	13	0	30	4	48	49	39	44	79

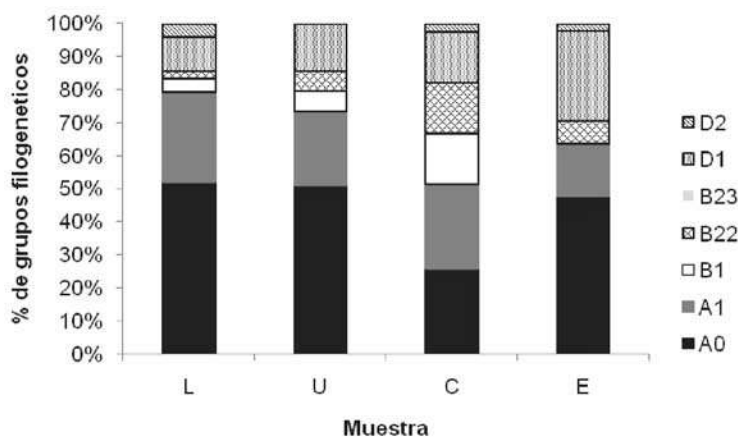
1, L, leche; U, ubre; S, material de cama; E, excreta.

2, Integrones Clase 1

3, NA, cepas sin asignación de patotipo, posiblemente comensales.

### Análisis y distribución de filogrupos

Las 180 cepas fueron asignadas dentro de cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) y siete subgrupos (A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B1, B2<sub>2</sub>, B2<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>). Como se muestra en la Figura 3, entre los grupos, el A fue el más abundante con 122 (67.77%) y el B1 el menos abundante con 11 (6.11%) cepas. El subgrupo A<sub>0</sub> fue el más abundante con 81 (45%) cepas y el D<sub>2</sub> el menos abundante con 4 (2.22%) cepas. Es interesante notar que cepas de los subfilogrupos A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B2<sub>2</sub> y D<sub>1</sub> fueron encontradas en todas las muestras, mientras que no se encontraron cepas del subfilogrupo B1 en excretas y del D<sub>2</sub> no fueron halladas en ubre (Fig. 3). Adicionalmente, no se encontraron cepas del subfilogrupo B2<sub>3</sub> en ningún tipo de muestra.



**Figura 3.** Distribución de subfilogrupos genéticos entre los aislados de *E. coli*. Se muestran los porcentajes dentro de cada filogrupos de los aislados de *E. coli* obtenidos de leche (L), ubres (U), material de cama (C) y excretas (E).

## Relación entre patrones de resistencia, patotipos y filogrupos

De las cepas MR 55 (67.07%) no fueron asignadas a ninguno de los patotipos buscados, posiblemente debido al hecho de que son comensales, aunque no puede excluirse la posibilidad de que pertenezcan al patotipo EHEC. Al patotipo ETEC-LT se asignaron 16 (19.51%) cepas, mientras que solo una (1.21%) resultó ser ETEC-LT/STa. El subfilogrupo que presentó más cepas MR fue el A<sub>0</sub> con 29 (35.36%), siendo el D<sub>2</sub> el que presentó menor cantidad con 2 (2.43%). Las cepas pertenecientes al filogrupo B2 presentaron una de las prevalencias más bajas de MR, ya que únicamente 9 (10.97%) cepas mostraron MR.

El patotipo que presentó el mayor número de cepas portadoras de IC1 fue ETEC con 11 (13.92%) cepas. En cuanto a la prevalencia de IC1 por filogrupo, se observó que el subfilogrupo A<sub>0</sub> es el que presentó mayor prevalencia de IC1 con 54.32%, siendo el B<sub>22</sub> el que presentó menor prevalencia de IC1, con 7.69% (Fig. 4). Las prevalencias de IC1 que se observaron en los diferentes filogrupos fueron A (52.45%)> B1 (27.27%)> B2 (7.6%) y D, (32.35%).

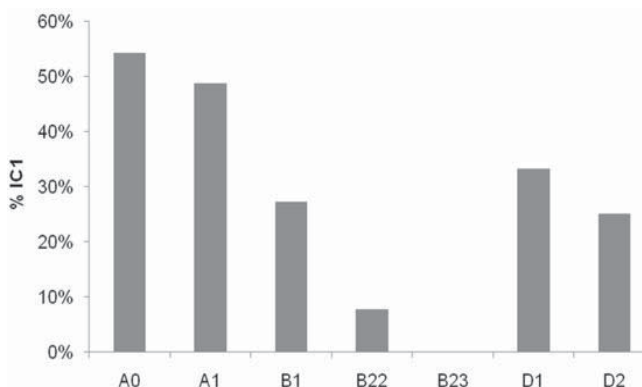


Figura 4. Prevalencia de integrones clase 1 (IC1) en los distintos filogrupos de los aislados de *E. coli*.

## V.4.4 DISCUSIÓN

### Resistencia y multiresistencia a antibióticos en los aislados de *E. coli*

En este trabajo el 85.55% de las 154 cepas de *E. coli* analizadas mostraron resistencia a por lo menos un antibiótico mientras que el 45.5% mostró un patrón de multiresistencia. Los reportes sobre resistencia a antibióticos en aislados

provenientes del ambiente de granjas lecheras son diversos y en algunos casos se muestran resultados diferentes, de acuerdo a la procedencia de los aislados estudiados. En particular, debido a sus implicaciones en la salud del ganado y las posibilidades de dispersión a la cadena alimenticia y al ser humano, es interesante contrastar los resultados aquí obtenidos de los aislados de ubre y excreta con algunos de los estudios previamente realizados en los mismos tipos de muestra. No obstante, algunas de las comparaciones realizadas a continuación deben ser tomadas con precaución, ya que no en todos los casos se utilizó el mismo método para evaluar la sensibilidad/resistencia de las cepas de estudio.

La prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes en ubres es importante ya que éstas pueden pasar a la leche y llegar al consumidor, además de su posible relación con mastitis ambiental. En el presente trabajo, de 49 cepas de ubres de vacas clínicamente sanas, el 51.02% fue resistente a AMP, 8.16% a NF y 10.20% a CRO. Srinivasan et al. (2007) reportaron que de 129 cepas de *E. coli* provenientes de ubres de vacas con mastitis, el 98.4% fue resistente a AMP, 38% a NF, 3.1% a CRO y 3.1% a CTX. En 163 aislados de *E. coli* de ubre de vacas con mastitis clínica, solo 20 aislados (12.3%) fueron resistentes a uno o más antibióticos, siendo las resistencias a estroptomicina (11.0%), sulfametoxazol (8.6%), ampicilina (7.4%) y tetraciclina (4.9%) las más abundantes, y 10 de las cepas fueron resistentes a los 12 antibióticos probados. (Bengtsson *et al.*, 2009).

La presencia de cepas resistentes en excreta también es importante, ya que como en el modelo aquí desarrollado (ver discusión general, Capítulo VI), estas pueden alcanzar la ubre y llegar a la leche. De 44 aislados de *E. coli* provenientes de excreta se ¿?% presentó un patrón de multiresistencia. Houser et al. (2008) encuentran una sensibilidad del 62% a todos los antibióticos probados (varios de los cuales fueron los mismos empleados en este trabajo) en 100 aislados provenientes de excreta de vacas sanas, y el 11% mostró resistencia 7 o más antibióticos. En otro estudio, de 223 aislados de *E. coli* de excretas de ganado clínicamente sano se encontró que el 40.4% (90 aislados) presentaba resistencia a 3 o más antibióticos, con el 50.67 (113 aislados) resistentes a tetraciclina, 33.63% (75 aislados) a ampicilina (Sawant *et al.*, 2007).

Se han aislado cepas de *E. coli* con altos niveles de resistencia en la excreta de becerros que no han sido tratados previamente con antibióticos, por lo que se ha planteado que las cepas resistentes a antibióticos pueden tener ventajas adaptativas para la sobrevivencia en el tracto digestivo de becerros lecheros, en comparación con las cepas no resistentes (Berge *et al.*, 2005). Con base en estudios previos, se ha hipotetizado que dichas ventajas adaptativas pueden incluir la producción de sideróforos, así como una mayor capacidad de adhesión, colonización, reproducción y diseminación (Berge *et al.*, 2005). Sería interesante evaluar a futuro si dichas características se encuentran presentes en las cepas de *E. coli* multirresistentes encontradas en el presente trabajo y si existe una diferencia significativa en ese sentido con las cepas comensales o entre filogrupos.

En granjas de países industrializados los antibióticos se han empleado con distintos fines incluidos el tratamiento y la prevención de enfermedades, así como el uso para promover el crecimiento (Sharma *et al.*, 2006; Kemper, 2008). Evidencia experimental indica que el uso de antibióticos en dosis terapéuticas y profilácticas selecciona cepas de *E. coli* con resistencia múltiple a antibióticos en el tracto digestivo de vacas lecheras (Berge *et al.*, 2006). Dicho trabajo se documentaron indicios de que la edad de los animales también puede ser un factor de selección de cepas de *E. coli* resistentes, independientemente de la administración de antibióticos. Este y otros estudios sugieren que la emergencia y diseminación de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos en el ambiente de la granja lechera depende de otros factores, además de la presión selectiva del uso de agente antimicrobianos (Call *et al.*, 2008). Una posibilidad es que la selección de resistencia a antibióticos este ligada que a otros factores genéticos que ayudan a la bacteria a sobrevivir en el ambiente de la granja, algo que necesita todavía ser evaluado (Call *et al.*, 2008).

El trabajo de Berg *et al.* (2006) también mostró que prácticamente no existe transferencia ambiental de cepas resistentes entre terneros de la misma granja. No obstante, las condiciones de manejo de las granjas de países desarrollados documentadas en la literatura, son distintas de las granjas estudiadas en el presente trabajo (Capítulo I). Aquí se ha presentado evidencia de que las prácticas de manejo de las granjas estudiadas pueden ser un factor de dispersión de bacterias Gram



negativas en general (Capítulo II) y de *E. coli* en particular (Capítulo III). Por otra parte, se desconoce el uso de antibióticos en las granjas aquí estudiadas, por lo que no se puede sostener que este es un factor de selección. Por lo anterior, sería importante documentar el uso de antibióticos en las granjas de estudio y relacionarlo con los datos aquí presentados.

### **Detección de integrones clase 1 (IC1) en los aislados de estudio.**

De las 180 cepas de *E. coli* analizadas, 79 (43.88%) mostraron presencia de IC1. La prevalencia de IC1 en cepas de *E. coli* aisladas de distintas muestras dentro de granjas lecheras ha sido documentada en diversos trabajos, reportándose valores más bajos y mas altos que el encontrado en este trabajo. Así en 58 aislados de *E. coli* provenientes de ubres de vacas con mastitis clínica se encontraron IC1 en 33% de estos, documentándose una correlación positiva entre las presencia de dichos elementos genéticos y la resistencia múltiple a antibióticos (Wang *et al.*, 2008). En cepas aisladas de excretas de bovinos se han llegado a reportar prevalencias de IC1 tan altas como del 86% (Barlow *et al.*, 2004), mientras que en becerrros con diarrea el valor reportado es de 59% (Du *et al.*, 2005). Dicho valor es muy parecido al de 52% reportado para cepas de *E. coli* en cepas provenientes de cerdos, aves de corral y ganado (Cocchi *et al.*, 2007).

En muestras ambientales de granjas lecheras también se ha encontrado la presencia de IC1. Srinivasan *et al.* (2008) observaron que la prevalencia de IC1 en enterobacterias aisladas de suelo de granjas fue más alta (89.3%) que en enterobacterias aisladas de suelo ajeno a granjas (45.8%). En contraste, al coleccionar distintas muestras de granjas lecheras, Yan *et al.* (2010) encontraron que de 573 cepas de distintas especies de bacterias estudiadas solo el 1.75% (n=10) presentaban IC1 distribuidos de la siguiente manera: 1 de 149 cepas provenientes de suelo, 3 de 179 de excretas en suelo, 2 de 43 de alimento, 1 de 33 de composta y 3 de 40 estiércol acumulado.

Varios de los aislados aquí estudiados mostraron patrones de bandeo múltiples. La presencia de múltiples bandas de amplificación para la detección de integrones clase 1 con los iniciadores empleados en este trabajo ha sido observada



previamente, pero no discutida sus posibles explicaciones. Una posibilidad es que dichos patrones indican la presencia de más de un evento de integración dentro de una misma cepa, y posiblemente cada integración contenga diferentes casetes de resistencia a antibióticos.

### **Identificación de patotipos en los aislados analizados**

La mayor parte de trabajos realizados para evaluar la presencia de patotipos de *E. coli* en el ambiente de granjas lecheras se han enfocado principalmente en la detección de cepas productoras de toxina shiga, STEC o EHEC (Conedera *et al.*, 2001; Schouten *et al.*, 2005; Fremaux *et al.*, 2006). En diversos reportes publicados, la prevalencia de STEC en tanques de leche ha sido reportada entre 0.8-3.8% (Steele *et al.*, 1997; Jayarao y Henning, 2001; Murinda *et al.*, 2002). Murinda *et al.* (2002) reportan la detección de *E. coli* O157:H7 en 8 de 30 (26.7%) granjas lecheras en diferentes tiempos de muestreo. El mismo grupo de trabajo (Murinda *et al.*, 2004) aisló los serotipos O26, O111, O103 y O157:H7 de EHEC de vacas lecheras y/o el ambiente de la granja.

Son pocos los trabajos que reportan patotipos distintos al STEC-EHEC en el ambiente de granjas lecheras, en particular de aquellos asociados en mayor proporción a enfermedades diarreicas en México. Se ha documentado la presencia del patotipo EPEC en excretas de ganado sano con una prevalencia del 59% de 51 cepas analizadas (Blanco *et al.*, 2005). Dicho porcentaje es significativamente mayor al encontrado en este trabajo, ya que de 44 cepas en excretas solamente una (2.2%) fue EPEC (tabla 1). Adicionalmente, al analizar los serogrupos O en 100 cepas de excretas de vacas lecheras sanas Houser *et al.* (2008) reportan la presencia de 27 cepas ETEC, 25 EPEC y 2 EIEC, aunque no se realizó un análisis molecular para encontrar los genes asociados a la identificación de dichos patotipos. Recientemente, Jones *et al.* (2011) reportaron no haber encontrado los patotipos EPEC, EAEC, EIEC, ETEC y STEC en aislados de *E. coli* obtenidos del suelo de granjas lecheras. Así, estos resultados muestran que tanto las vacas como el ambiente de las granjas lecheras analizadas son reservorios de los patotipos de *E. coli* de mayor incidencia

en enfermedades diarreagénicas en México (Bouckenooghe *et al.*, 2002; Paniagua *et al.*, 2007; Estrada-García *et al.*, 2009; Flisser *et al.*, 2002).

En este trabajo también se documentó la presencia de los patotipos EPEC y ETEC en la leche obtenida en las granjas estudiadas, indicando la contaminación fecal del producto (Altalhi y Hassan, 2009). El patotipo EPEC ha sido reportado previamente en leche bronca, aunque no es claro en dicho trabajo si la leche en donde se encontró es de bovino, ya que se analizaron muestras de distintos animales.

La presencia de los distintos patotipos de *E. coli* encontrados en los animales y el ambiente de las granjas estudiadas y la leche producida en éstas tiene implicaciones de relevancia en salud pública, ya que la transmisión a humanos puede ocurrir por contacto directo con excretas contaminadas con estos patógenos, como resultado del manejo de excretas o por el consumo de leche y sus derivados que fueron contaminados durante la ordeña (McGarvey *et al.*, 2004). Adicionalmente, el ganado bovino puede ser portador asintomático de cepas de *E. coli* patógenas para el hombre (Oliver *et al.*, 2005), lo que aumenta el riesgo de brotes diarreicos asociados al consumo de leche contaminada o productos derivados de esta (Oliver *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2008).

### **Distribución de filogrupos**

La composición filogenética de las cepas de *E. coli* de las granjas estudiadas fue A (67.77%)>D (18.88)>B2 (7.22)>B1 (6.11%). Este patrón de abundancia es cualitativamente consistente con reportes previos de aislados de *E. coli* provenientes de vacas lecheras. Así, en 144 aislados de *E. coli* asociados a mastitis clínica el orden de abundancia de los filogrupos encontrados fue A (82.6%) > D (16.11%)> B1 (7.49%) > B2 (2.14%) (Suojala *et al.*, 2011). En otro estudio realizado con seis cepas persistentes y transitorias de *E. coli* provenientes de mastitis clínica, todas pertenecían al filogrupo A (Dogan *et al.*, 2006). También, los aislados de *E. coli* obtenidos de vacas con fiebre puerperal pertenecen principalmente a los filogrupos A y B1 (Silva *et al.*, 2009). No obstante, los reportes sobre filogrupos presentes en excretas documentan diferencias con estos patrones de abundancia. Así, al analizar 100 cepas de *E. coli* aisladas de excretas de vacas sanas en lactación se encontró

que las abundancias relativas eran B1 (58%)>A (26%)>B2 (10%)>D (6%) (Houser *et al.*, 2008). Mientras que en otro estudio con aislados del mismo tipo de muestra el orden de abundancia fue B1 (58.3%) > A (27.4%) > D (11.5%) > B2 (2.8%) (Walk *et al.*, 2007). De los 44 aislados obtenidos de muestras de excretas en este trabajo el orden de abundancia de los filogrupos encontrados fue A (63.63%)>D (29.54%)>B2 (6.81%)>B1 (0%).

Debido a que la mastitis ocasionada por *E. coli* es considerada de origen ambiental, todo lo anterior indica que en el ambiente de la granja y el tracto digestivo de las vacas se presenta una presión selectiva que favorece la presencia de cepas de los filogrupos A y B1. No obstante, dichos patrones de incidencia también indican que mientras que el filogrupo A, asociado principalmente a procesos patológicos en vacas, el filogrupo B1 es preferencialmente seleccionado en el tracto digestivo de estas, aunque en este sentido los resultados aquí presentados no coinciden con lo reportado previamente. Una posibilidad es que la dieta de las vacas analizadas en este trabajo, consistente de alfalfa, maíz, sorgo rastrojo de maíz y concentrado (ver Capítulo I), excluya al filogrupo B1, el cual es el más abundante en otros estudios (Walk *et al.*, 2007; Houser *et al.*, 2008), posiblemente debido a diferencias en las dietas de las vacas estudiadas. Se ha documentado que variaciones en la dieta de las vacas lecheras en combinación con factores ambientales pueden modificar la diversidad de *E. coli* de las excretas de los animales (Jarvis *et al.*, 2000) Otra posibilidad es que que la abundancia relativa de filogrupos presente variaciones estacionales en el ambiente de la granja, lo cual influye en el filogrupo que en determinado momento puede llegar al tracto de las vacas y ser excretado, hipótesis que necesita ser evaluada.

Tanto la presión selectiva como los factores que pueden causar fluctuaciones en la abundancia relativa de los filogrupos de *E. coli* en el ambiente de la granjas aquí estudiadas se desconocen, pero reportes previos han proporcionado hipótesis sobre los factores que pueden influir en la abundancia relativa de estos en distintos hábitats o nichos. Se ha propuesto que el clima y la proximidad con actividades humanas pueden influenciar la distribución relativa de los grupos filogenéticos de *E. coli* en los hospederos (Gordon y Cowling, 2003). Por otro lado, algunas

características del hospedero como la dieta, la morfología estomacal y la masa corporal al parecer son predictores importantes de la distribución de los grupos filogenéticos (Gordon y Cowling, 2003; Johnson *et al.*, 2008). Sin embargo, gran variabilidad resulta del ambiente en que una población humana o animal vive (Gordon y Cowling, 2003). En animales, la principal fuerza ambiental que organiza la estructura genética de la población de *E. coli* estomacal es el estatus de domesticación del huésped (Escobar-Paramo *et al.*, 2006). Así, se ha observado que en los animales de granja y zoológico la prevalencia de las cepas del filogrupo B2 es de 14% y 11%, respectivamente, mientras que en los animales silvestres ésta es del 30%. En contraste, los animales de granja y zoológico presentan proporciones del 27% y 26% del filogrupo A, respectivamente, mientras que los silvestres únicamente del 14% (Ochman y Selander, 1984; Gordon y Cowling, 2003; Escobar-Paramo *et al.*, 2006; Baldy-Chudzik *et al.*, 2008).

Los resultados de abundancia de patotipos son consistentes con los resultados de filogrupos obtenidos en las granjas de estudio, ya que el 67.77% se ubicó en el filogrupo A y 63.88% no fueron asignadas a ningún patotipo buscado. El filogrupo A está constituido principalmente por cepas comensales que no son patógenas en hospederos sanos (Clermont *et al.*, 2000) y portan pocos factores de virulencia. Cepas patógenas intestinales de *E. coli* han sido encontradas en los grupos A, B1 y D (Picard *et al.*, 1999; Russo y Johnson, 2000), mientras que las patógenas extra- intestinales se han encontrado principalmente en los filogrupos B2 y D (Clermont *et al.*, 2000). Se ha documentado que las cepas de *E. coli* asociados a procesos patogénicos con vacas lecheras carecen de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* invasivas (Dogan *et al.*, 2006) o tienen bajo potencial de virulencia (Silva *et al.*, 2009). Además, los estudios realizados en cepas de *E. coli* comensales muestran que éstas carecen de las características de especializadas de virulencia presentes en las cepas patógenas (Russo y Johnson, 2000). Por lo anterior, los resultados aquí presentados indican que en el ambiente de las granjas estudiadas prevalecen cepas de *E. coli* comensales, aunque algunas con potencial patogénico en vacas lecheras. No obstante, es importante considerar que en el presente trabajo no se estudió al patotipo EHEC, ya que tanto datos oficiales de salud pública en

México (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002), como reportes de la literatura especializada (Bouckenooghe *et al.*, 2002; Paniagua *et al.*, 2007; Estrada-Garcia *et al.*, 2009; Flisser *et al.*, 2002), coinciden en que dicho patotipo no está entre los principales agentes etiológicos causantes de enfermedades diarreicas en México.

### **Relaciones entre filogrupos, resistencia y patogenicidad**

En este trabajo únicamente 9 (10.97%) de las cepas pertenecientes al filogrupo B2 presentaron MR. Este resultado es consistente con reportes que documentan que las cepas del filogrupo B2 son más sensibles a antibióticos que las cepas de otros grupos filogenéticos (Picard *et al.*, 1999), especialmente a quinolonas (Johnson *et al.*, 2002; Kuntaman *et al.*, 2005).

De las 180 cepas, 65 (36.11%) portaron algún gen de patogenicidad, considerándose como diarregénicas. Estas se clasificaron dentro de los filogrupos A, B1 y D, a los que usualmente pertenecen las cepas patógenas intestinales (Pupo *et al.*, 1997), ya que las cepas patógenas extraintestinales usualmente ha reportado dentro de los grupos B2 y D (Picard *et al.*, 1999; Johnson y Stell, 2000) y las cepas comensales dentro de los grupos A y B1 (Bingen *et al.*, 1998). Es importante resaltar que el grupo A incluye la mayoría de las cepas comensales y cepas dirreagénicas (Clermont *et al.*, 2000). Por otro lado se ha reportado que las cepas de los filogrupos B2 y D contienen más factores de virulencia que las cepas de los filogrupos A y B1 (Johnson *et al.*, 2001). En este sentido, nuestros datos concuerdan con la literatura ya que dentro de los filogrupos B2 y D encontramos 47 cepas pertenecientes a los 4 patotipos buscados (EIEC, EPEC, ETEC-LT y ETEC-STa).

Un estudio previo realizado en aislados de *E. coli* obtenidos de excreta de vacas en lactación y becerros mostró que los aislados que presentaron integrones clase 1 pero fueron susceptibles a antibióticos y aquellos aislados susceptibles que no mostraron presencia de integrones pertenecían mayoritariamente al filogrupo B1. El grupo que presentó integrones y fué resistente a antibióticos estaba compuesto por un número significativamente mayor de cepas de los filogrupos A, B2 y D que el grupo anterior de cepas susceptibles (Walk *et al.*, 2007). Más aún, estas tendencias se repiten en aislados de *E. coli* provenientes de otras fuentes. Skurnik *et al.* (2009)

reportaron en cepas provenientes de personas con infección de vías urinarias prevalencias de integrones de A, 57.7%; B1, 71.3%; B2, 40.2% y D, 64.7%; mientras que Mokracka et al. (2011) en cepas proveniente de plantas de tratamientos de aguas residuales documentan 30.3, 19.3, 13.8 y 36.7% para los grupos A, B1, B2 y D respectivamente.

Dichos resultados concuerdan en términos generales con nuestros datos, lo que parece indicar que los filogrupos A y D tienen una mayor capacidad de captación de integrones clase 1 que el resto de filogrupos y que el filogrupo B2 es el que menor capacidad de incorporación de dichos elementos genéticos. Sería interesante establecer experimentos que pudieran corroborar dicha hipótesis y de ser cierta encontrar los determinantes genéticos asociados a este comportamiento.

#### **V.4.5 CONCLUSIONES**

Los resultados aquí presentados muestran que existe una alta prevalencia de cepas MR portadoras de integrones tanto en los animales como en el ambiente de las granjas lecheras analizadas. Esto quizá se deba a la presión selectiva ejercida al usar antibióticos como práctica común en este tipo de granjas. La presencia de integrones de diferentes tamaños en la mayoría de las cepas en los ambientes de la granja puede resultar en la adquisición de genes de resistencia adicionales, que pueden ser diseminados a otras poblaciones bacterianas en el ambiente de la granja. Finalmente desde el punto de vista de salud pública es preocupante encontrar cepas diarreagénicas de *E. coli* MR portadoras de integrones clase 1, ya que pueden causar infecciones en el ser humano.

#### **V.4.6 REFERENCIAS**

Ahmed A. M., Younis E. E. A., Osman S. A., Ishida Y., El-khodery S. A., and Shimamoto T. 2009. **Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves.** *Veterinary Microbiology* doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.021

- Altalhi A. D., and Hassan S. A. 2009. **Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers.** *Food Control* 20:913-917.
- Armstrong G. L., Hollingsworth J., and Morris J. G. 1996. **Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world.** *Epidemiologic Reviews* 18:29-51.
- Baldy-Chudzik K., Mackiewicz P., and Stosik M. 2008. **Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo.** *Veterinary Microbiology* 131:173-184.
- Barlow R. S., Pemberton J. M., Desmarchelier P. S., and Gobius K. S. 2004. **Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:838-842.
- Bengtsson B., Unnerstad H. E., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Öst M., and Waller K. P. 2009. **Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows.** *Veterinary Microbiology* 136:142-149.
- Berge A. C. B., Atwill E.R., and Sisco W.M. 2005. **Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves.** *Preventive Veterinary Medicine* 69:25-38.
- Berge A. C. B., Moore D. A., and Sisco W. M. 2006. **Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves.** *Applied and Environmental Microbiology* 72:3872-3878.
- Bingen E., Picard B., Brahimi N., Mathy S., Desjardins P., Elion J., and Denamur E. 1998. **Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strain.** *Journal of Infectious Diseases* 177:642-650.



- Blanco M., Schumacher S., Tasara T., Zweifel C., Blanco J. E., Dahbi G., Blanco J., and Stephan R. 2005. **Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae- $\eta$ 2).** *BMC Microbiology* 5:23.
- Bouckenooghe A. R., Jiang Z. D., De la Cabada F. J., Ericsson C. D., and DuPont H. L. 2002. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico.** *Journal of Travel Medicine* 9:137-140.
- Burgos J. M., Ellington B. A., and Varela M. F. 2005. **Presence of multidrug-resistant enteric bacteria in dairy farm topsoil.** *Journal of Dairy Science* 88:1391-1398.
- Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., and Duchateau L. 2003. **Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors.** *Veterinary Research* 34:521-564.
- Call D. R., Davis M. A., and Sawant A. A. 2008. **Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production.** *Animal Health Research Reviews* 9:159-167.
- Cambray G., Guerout A. M., and Mazel D. 2010. **Integrans.** *Annual Review of Genetics* 44:141-66.
- Clermont O., Bonacorsi S., and Bingen E. 2000. **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.** *Applied and Environmental Microbiology* 66:4555-4558.
- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard.** 3rd ed. CLSI document M31-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cocchi S., Grasselli E., Gutacker M., Benagli C., Convert M., and Piffaretti J. C. 2007. **Distribution and characterization of integrans in *Escherichia coli* strains of animal and human origin.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50:126-132.



- Conedera G., Chapman P. A., Marangon S., Tisato E., Dalvit P., and Zuin A. 2001. **A field survey of *Escherichia coli* O157 ecology on a cattle farm in Italy.** *International Journal of Food Microbiology* 66:85-93.
- Cortés-Ortiz I. A., Rodríguez-Angeles G., Moreno-Escobar E. A., Tenorio-Lara J. M., Torres-Mazadiego B. P. y Montiel-Vázquez E. 2002. **Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México.** *Salud Publica de México* 44:297-302.
- Dogan B., Klaessig S., Rishniw M., Almeida R. A., Oliver S. P., Simpson K., and Schukken Y. H. 2006. **Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology* 116:270-282.
- Du X., Shen Z., Wu B., Xia S., and Shen J. 2005. **Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*.** *FEMS Microbiology Letters* 245:295-298.
- Escobar-Páramo P., Le Menac'h A., Le Gall T., Amarin C., Gouriou S., Picard B., Skurnik D., and Denamur E. 2006. **Identification of forces shaping the comensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates.** *Environmental Microbiology* 8:1975-1984.
- Estrada-Garcia T., Lopez-Saucedo C., Thompson-Bonilla R., Abonce M., Lopez-Hernandez D., Santos J. I., Rosado J. L., DuPont H. L., and Long K. Z. 2009. **Association of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes with infection and diarrhea among mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea.** *Journal of Clinical Microbiology* 47:93-98.
- Fischer-Walker C. L., Sack D., and Black R. E. 2010. **Etiology of Diarrhea in Older Children, Adolescents and Adults: A Systematic Review.** *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4:768.

- Flisser A., Velasco-Villa A., Martínez-Campos C., González-Domínguez F., Briseño-García B., García-Suárez R., Caballero-Servín A., Hernández-Monroy I., García-Lozano H., Gutiérrez-Cogco L., Rodríguez-Angeles G., López-Martínez I., Galindo-Virgen S., Vázquez-Campuzano R., Balandrano-Campos S., Guzmán-Bracho C., Olivo-Díaz A., de la Rosa J. L., Magos C., Escobar-Gutiérrez A., and Correa D. 2002. **Infectious diseases in Mexico. a survey from 1995–2000.** *Archives of Medical Research* 33:343-350.
- Fluit A. C., and Schmitz F. J. 1999. **Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology.** *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18:761-770.
- Fremaux B., Prigent-Combaret C., and Vernozy-Rozand C. 2008. **Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an update review.** *Veterinary Microbiology* 132:1-18.
- Fremaux B., Raynaud S., Beutin L., and Rozand C. V. 2006. **Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms.** *Veterinary Microbiology* 117:180-191.
- Gordon D. M. 2004. **The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*.** In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* American Society for Microbiology <http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>. (6 de junio del 2011)
- Gordon D. M., and Cowling A. 2003. **The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects.** *Microbiology* 149:3575-3586.
- Herzer P. J., Inouye S., Inouye M., and Whittam T. S. 1990. **Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 172:6175-6181.
- Hogan J., and Smith K. L. 2003. **Coliform mastitis.** *Veterinary Research* 34:507-519.

- Houser B. A., Donaldson S. C., Padte R., Sawant A. A., DebRoy C., and Jayarao B. M. 2008. **Assessment of phenotypic and genotypic diversity of *Escherichia coli* shed by healthy lactating dairy cattle.** *Foodborne Pathogens and Disease* 5:41-51.
- Jarvis GN, Kizoulis MG, Diez-Gonzalez F, and Russell JB. 2000. The genetic diversity of predominant *Escherichia coli* strains isolated from cattle fed various amounts of hay and grain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32:225–233.
- Jayarao B. M., and Henning D. R. 2001. **Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk.** *Journal of Dairy Science* 84:2157-2162.
- Jayarao B. M., and Henning D. R. 2001. **Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk.** *Journal of Dairy Science* 84:2157-2162.
- Johnson J. R., and Russo T. A. 2002. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”.** *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139:155-162.
- Johnson J. R., and Stell A. L. 2000. **Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.** *Journal of Infectious Diseases* 181:261-272.
- Johnson J. R., Clabots C., and Kuskowski M. A. 2008. **Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members.** *Journal of Clinical Microbiology* 46:4078-4082.
- Johnson J. R., Delavari P., Kuskowski M., and Stell A. L. 2001. **Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*.** *Journal of Infectious Diseases* 183:78-88.
- Jones S. E., Burgos J. M., Lutnesky M. M. F., Sena J. A, Kumar S., Jones L. M., and Varela M. F. 2011. **Dairy farm age and resistance to antimicrobial agents in *Escherichia coli* isolated from dairy topsoil.** *Current Microbiology.* 62:1139-1146.
- Kaper J. B., Nataro J. P., and Mobley H. L. 2004. **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nature Reviews Microbiology* 2:123-140.

- Kemper N. 2008. **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment.** *Ecological Indicators* 8:1-13.
- Kuntaman K., Lestari E. S., Severin J. A., Kershof I. M., Mertaniasih N. M., Purwanta M., Hadi U., Johnson J. R., van Belkum A., and Verbrugh H. A. 2005. **Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Indonesia.** *Emerging Infectious Diseases* 11:1363-1369.
- McGarvey J. A., Miller W. G., Sanchez S., and Stanker L. 2004. **Identification of bacterial populations in dairy wastewaters by use of 16S rRNA gene sequences and other genetic markers.** *Applied and Environmental Microbiology* 70:4267-4275.
- Mokracka J., Koczura R., Jabłońska L., and Kaznowski A. 2011. **Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:817-24.
- Murinda S. E., Nguyen L. T., Ivey S. J., Gillespie B. E., Almeida R. A., Draughon F. A., and Oliver S. P. 2002. **Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee.** *Journal of Food Protection* 65:752-759.
- Murinda S. E., Nguyen L. T., Landers T. L., Draughon F. A., Mathew A. G., Hogan J. S., Smith K. L., Hancock D. D., and Oliver S. P. 2004. **Comparison of *Escherichia coli* isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of Shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers.** *Foodborne Pathogens and Disease* 1:178-184.
- Muto T., Matsumoto Y., Yamada M., Ishiguro Y., Kitazume H., Sasaki K., and Toba M. 2008. **Outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections among children with animal contact at a dairy farm in Yokohama city, Japan.** *Japanese Journal of Infectious Diseases* 61:161-162.
- Nataro J. P., and Kaper J. B. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.

- Ochman H., and Selander R. K. 1984. **Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations.** *Journal of Bacteriology* 157:690-693.
- Oliver S. P., Jayarao B. M., and Almeida R. A. 2005. **Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications.** *Foodborne Pathogens and Disease* 2:115-129.
- Paniagua G. L., Monroy E., García-González O., Alonso J., Negrete E., and Vaca S. 2007. **Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6:17.
- Peters E. D. J., Leverstein-Van Hall M. A., Box A. T. A., Verhoef J., and Fluit A. C. 2001. **Novel Gene Cassettes and Integrons.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2961-2964.
- Picard B., Garcia J. S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., and Denamur E. 1999. **The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection.** *Infection and Immunity* 67:546-553.
- Ploy M. C., Lambert T., Couty J. P., and Denis F. 2000. **Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system.** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 38:483-487.
- Price L. B., Graham J. P., Lackey L. G., Roess A., Vailes R., and Silbergeld E. 2007. **Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers.** *Environmental Health Perspectives* 115:1738-1742.
- Pupo G. M., Karaolis D. K. R., Lan R., and Reeves P.R. 1997. **Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies.** *Infection and Immunity* 65:2685-2692.
- Qadri F., Svennerholm A. M., Faruque A. S. G., and Sack R. B. 2005. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention.** *Clinical Microbiology Reviews* 18:465-483.

- Reid S. D., Herbelin C. J., Bumbaugh A. C., Selander R. K., and Whittam T. S. 2000. **Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli***. *Nature* 406:64-67.
- Rocourt J., Moy G., Vierk K., and Schlundt J. 2003. The present state of foodborne disease in OECD countries Food Safety Department. WHO, Geneva. pp 1-32
- Rosales-Castillo Jesús Andrei, Vázquez Garcidueñas Ma. Soledad, Álvarez Hernández Hugo, Chassin Noria Omar, Varela Murillo Alba Irene, Zavala Páramo María Guadalupe, Cano Camacho Horacio, and Vázquez Marrufo Gerardo. 2011. **Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* from neighboring small-scale dairy farms**. *The Journal of Microbiology* DOI 10.1007/s12275-011-0461-2
- Russo T. A., and Johnson J. R. 2000. **Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC**. *Journal of Infectious Diseases* 181:1753-1754.
- Sambrook J., and Russell D. W. 2001. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarmah A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A. 2006. **A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment**. *Chemosphere* 65:725-759.
- Sawant A. A., Hegde N. V., Straley B. A., Donaldson S. C., Love B. C., Knabel S. J., and Jayarao B. M. 2007. **Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle**. *Applied and Environmental Microbiology* 73:156-163.
- Scallan E., Hoekstra R. M., Angulo F. J., Tauxe R. V., Widdowson M. A., Roy S. L., Jones J. L., and Griffin P. M. 2011. **Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens**. *Emerging Infectious Disease* 17:7-15.
- Schouten J. M., Graat E. A. M., Frankena K., van de Giessen A. W., van der Zwaluw W. K., and de Jong M. C. M. 2005. **A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm and in the farm environment**. *Veterinary Microbiology* 107:193-204.

- Schwarz S., and Chaslus-Dancla E. 2001. **Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance.** *Veterinary Research* 32:201-25.
- Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H., Musser M., Gilmour M. N., and Whittam T. S. 1986. **Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.** *Applied and Environmental Microbiology* 51:873-884.
- Shpigel N. Y., Elazar S., and Rosenshine I. 2008. **Mammary pathogenic *Escherichia coli*.** *Current Opinion in Microbiology* 11:60-65.
- Silva E., Leitão S., Tenreiro T., Pomba C., Nunes T., Lopes da Costa L., Mateus L. 2009. **Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows.** *Journal of Dairy Science* 92:6000-10.
- Skurnik D., Lacheeb S., Bernede C., le Menac'H A., Elbaz S., Mohler J., Denamur E., Andremont A., and Ruimy R. 2009. **Integrins and antibiotic resistance in phylogenetic group B2 *Escherichia coli*.** *Microbial Drug Resistance* 15:173-178.
- Srinivasan V., Gillespie B. E., Lewis M. J., Nguyen L. T., Headrick S. I., Schukken Y. H., and Oliver S. P. 2007. **Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis.** *Veterinary Microbiology* 124:319-328.
- Srinivasan V., Nam H. M., Sawant A. A., Headrick S. I., Nguyen L. T., and Oliver S. P. 2008. **Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrins in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils.** *Microbial Ecology* 55:184-193.
- Steele M. L., McNab W. B., Poppe C., Griffiths M. W., Chen S., Degrandis S. A., Fruhner L. C., Larkin C. A., Lynch J. A., and Odumeru J. A. 1997. **Survey of Ontario bulk tank milk for foodborne pathogens.** *Journal of Food Protection* 60:1341-1346.



- Suojala L., Pohjanvirta T., Simojoki H., Myllyniemi A. L., Pitkälä A., Pelkonen S., and Pyörälä S. 2011. **Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology* 147:383-388.
- Van den Bogaard A. E., and Stobberingh E. E. 2000. **Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:327-335.
- Walk S. T., Mladonicky J. M., Middleton J. A., Heidt A. J., Cunningham J. R., Bartlett P., Sato K., and Whittam T. S. 2007. **Influence of antibiotic selection on genetic composition of *Escherichia coli* populations from conventional and organic dairy farms.** *Applied and Environmental Microbiology* 73:5982-5989.
- Wang G. Q., Wu C. M., Du X. D., Shen Z. Q., Song L. H., Chen X., and Shen J. Z. 2008. **Characterization of integrons-mediated antimicrobial resistance among *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis.** *Veterinary Microbiology* 127:73-78.
- Wenz J. R., Barrington G. M., Garry F. B., Ellis R. P., and Magnuson R. J. 2006. ***Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity.** *Journal of Dairy Science* 89:3408-3412.
- Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L. H., Karch H., Reeves P. R., Maiden M. C., Ochman H., and Achtman M. 2006. **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective.** *Molecular Microbiology* 60:1136-1151.
- Yang H., Oleksandr A. Byelashov, Geornaras I., Goodridge L.D., Nightingale K. K., Belk K. E., Smith G. C., and Sofos J. N. 2010. **Characterization and transferability of class 1 integrons in commensal bacteria isolated from farm and nonfarm environments.** *Foodborne Pathogens and Disease* 7:1441-1451.



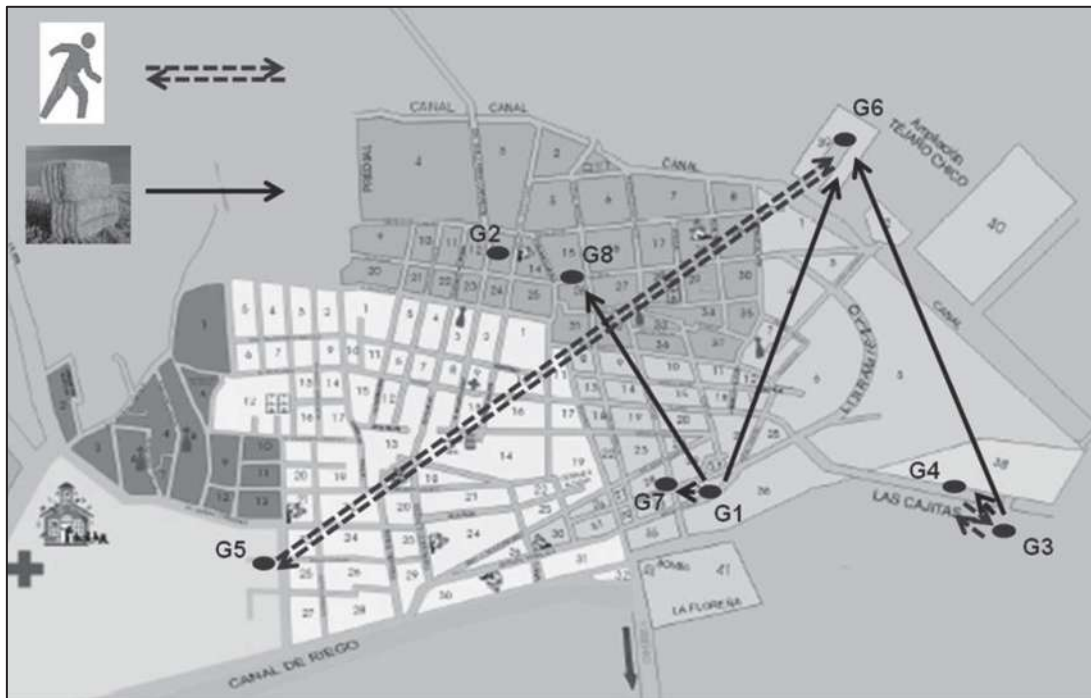
## VI. DISCUSIÓN GENERAL

### UN MODELO DE RELACIONES ENTRE PRÁCTICAS DE PRODUCCIÓN Y RIESGOS DE CONTAMINACIÓN BACTERIANA EN LAS GRANJAS ESTUDIADAS

Los resultados obtenidos al realizar el análisis tanto de comunidad de enterobacterias (Capítulo II) como de diversidad de la población de *E. coli* (Capítulo III), indican un flujo de bacterias tanto entre granjas como dentro del ambiente de las granjas estudiadas. El hecho de que las comunidades de algunas granjas o tipos de muestra tengan la misma estructura de la comunidad de enterobacterias o compartan genotipos de *E. coli* apoya dicha hipótesis.. Al contrastar esta información con las relaciones de las prácticas productivas de las granjas estudiadas surgen patrones interesantes, algunos de los cuales se comentan en los capítulos II y III, pero cuyo análisis se complementa en este capítulo, incluyendo a todas las granjas de estudio. Una primera observación es que las granjas que comparten personal de ordeño y alimento de ganado son aquellas que presentan similitud en la estructura de la comunidad de enterobacterias y comparten genotipos de *E. coli*. Así, dicha observación indica que los flujos de intercambio bacteriano entre las granjas de estudio están relacionados con la movilización del personal de ordeño y el alimento del ganado (Fig. 1).

De todas las granjas analizadas en el estudio microbiológico, la granja G1 es la que posee el área techada más grande, por lo que se utiliza para almacenar el alimento (rastrajo de maíz) proveniente de las parcelas de los mismos productores. En un periodo que oscila entre uno y tres días los productores de las granjas G7 y G8 pasan a la granja G1 para llevar alimento a sus respectivas granjas. De manera interesante, estas tres granjas fueron las que presentaron la mayor incidencia de aislados de *Shigella flexneri* (G1=8; G7=13 y G8= 9) y de *Brenneria rubrifaciens* (G1=9; G7=12 y G8=14), provenientes principalmente del material de cama y las excretas. Otros patógenos que se encontraron particularmente en estas granjas fueron *Escherichia coli* enterotoxigénica-LT, con 11 cepas en G1 aisladas de todos los tipos de muestra, una de ubre y tres de excretas en G7 y una de material de cama y de excretas en G8. También se encontró *Klebsiella oxytoca* de la cual se

aisló una cepa de excretas, una de leche y una de ubre de G1, G7 y G8, respectivamente. De las observaciones realizadas en dicho grupo de granjas se plantea la posibilidad de que las enterobacterias comunes estén presentes en el rastrojo de éstas, y que una vez consumido por el hato sean desechadas en las excretas. Debido al uso de las excretas como abono para las parcelas en las que se cosecha el alimento que se guarda en la granja G1, de todos los grupos bacterianos que comparten esta granjas, la identificación de *B. rubrifaciens*, bacteria fitopatógena, apoya la hipótesis de un ciclo de contaminación parcela-alimento-ganado-excreta-parcela. Por otra parte, la presencia de esta misma especie en el material de cama, compuesto por una mezcla de tierra, excretas y rastrojo, y su aislamiento de muestras de leche y ubre provenientes de las tres granjas (G1, G7 y G8), permiten suponer que la contaminación de la leche se da a partir de la introducción del alimento en ambiente de la granja.



**Figura 1. Mapa de la zona de estudio.** Señalando las granjas que comparten personal de ordeño o el alimento del ganado. Flecha negra, flujo de alimento; flecha punteada, flujo de personal de ordeño.

Aunque la granja G6 también obtiene alimento de la granja G1, el flujo de dicho material es considerablemente menor entre estas dos granjas que aquel que

presenta G1 con las granjas anteriormente analizadas. Esto podría explicar porque la granja G6 presentó el menor número de cepas de *E. coli*-LT, *B. rubrifaciens* y *S. flexneri* con 1, 2 y 3, respectivamente. Solo G1 y G6 presentaron cepas ETEC-LT/STa, encontrándose una en material de cama y una en excretas dentro de G1 y una en este último tipo de muestra en G6.

Otro grupo de granjas que comparten el alimento del ganado es el formado por G3, G4 y G6. En este caso se presenta una circunstancia similar a la anterior, el alimento se guarda en G3, proporcionándole suministros a la granja G4, con la que los productores tienen vínculos familiares, y a G6 por razones de amistad. Estas granjas presentaron alta incidencia de *E. coli*, encontrándose 28 cepas en G3, 39 en G4 y 27 en G6, las cuales están presentes en todos los tipos de muestra. Por otro lado, en estas granjas se obtuvo 62.5% de cepas ETEC-STa, dos en leche y dos en ubre en el caso de G3, una en cada tipo de muestra en G4 y una en leche y en excreta en G6. De estas granjas solo en G3 y G4 se encontraron cepas de los patotipos EPEC y EIEC, en el caso de G3 se encontró una de cada patotipo en ubre y en G4 también una de cada patotipo en leche. Además, solo en las granjas G3 y G6 se aisló *Enterobacter cowanii*, con una cepa en cada caso. En estas granjas, tanto las cepas comensales como las patógenas de *E. coli* se dispersan en el ambiente contaminando la leche, como se expuso en el capítulo III.

Además de alimento para el ganado, las granjas G3 y G4 comparten personal de ordeño (Fig. 1), ya que un trabajador de la granja G4, por falta de personal y debido al parentesco, ayuda en las labores de G3 en actividades que además del ordeño, incluyen la limpieza de la granja y la alimentación del ganado. Estas dos granjas presentan un alto número de cepas de *E. coli*, como se mencionó anteriormente, y los patotipos encontrados son comunes. Del patotipo EPEC, se encontró una cepa en ubre y una en material de cama de G3 y G4, respectivamente, las cepas del patotipo EIEC están distribuidos de la misma manera y las de ETEC-STa, se presentan dos cepas en leche y dos en ubre para G3 y cuatro cepas distribuidas en los cuatro tipos de muestra en el caso de G4. Otro patógeno en común entre estas granjas es *Klebsiella oxytoca*, del que se aisló una cepa en ubre en G3 y una cepa en excretas de G4. La presencia de EPEC y EIEC, tanto en

material de cama de G3 como en ubre de G4, sugiere que la dispersión de dichos patotipos puede ser promovida por el personal común, quién después de realizar sus labores de limpieza en la granja G3 cumple con las funciones de ordeña en G4. La presencia de *K. oxytoca* en ambas granjas sugiere que después de lavar las ubres del ganado para ordeñar, el trabajador contamina el alimento que es llevado de G3 a G4, explicando por qué dicha especie es encontrada en la excreta de las animales de dicha granja. Así, tanto en el caso de los patotipos de *E. coli* como en el de *K. oxytoca* en estas granjas, el factor que parece influir en la dispersión, es de malas prácticas de higiene, particularmente de las manos, del personal común.

Las granjas G5 y G6 también comparten personal de ordeño, siendo un trabajador el que después de terminar la ordeña en la granja G5 se traslada a la granja G6 a realizar la misma función. En estas dos granjas se aisló *S. flexneri*, dos cepas en material de cama y dos en excretas en el caso de G5 y una en material de cama y dos en excretas para G6. En el caso de *E. coli*, en estas granjas se presentan los patotipos ETEC-LT, una cepa en leche, dos en material de cama y una en excretas para G5, y para G6 una en excretas. Del patotipo ETEC-STa se aisló una cepa en ubre para G5 y una en leche y una en excretas para G6. Al estar presente ETEC-STa en la ubre del ganado de G5 podría contaminar la leche durante la ordeña en G6, ya que el trabajador tiene contacto con la ubre del ganado de las dos granjas.

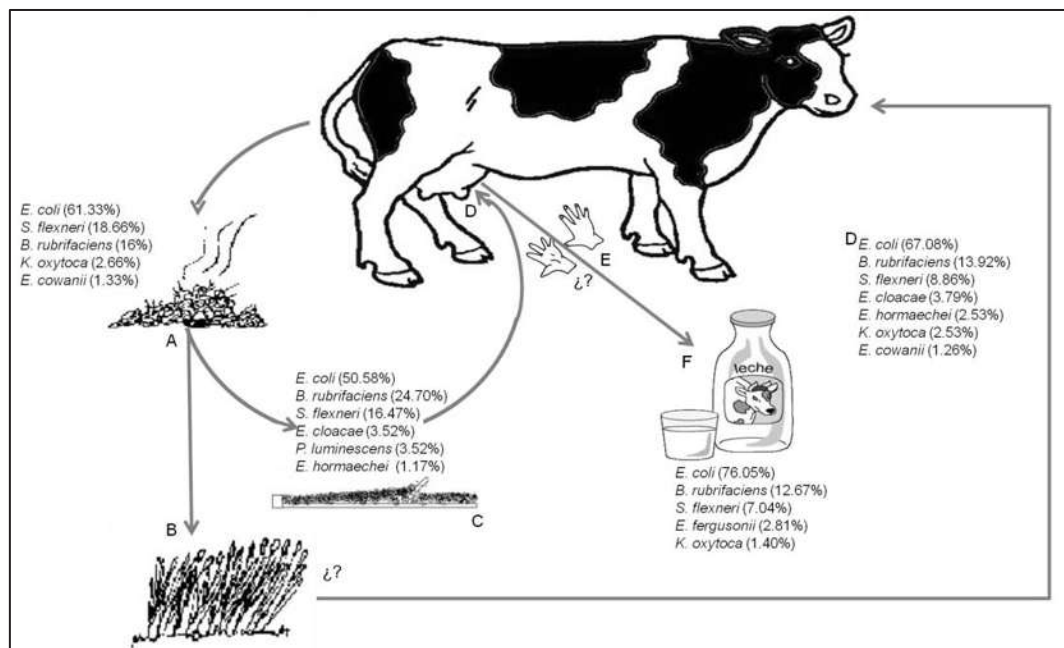
La granja G2 es la única que mantiene autonomía con respecto al resto de las granjas en relación a personal o alimento. Esta característica, en combinación con el hecho de ser la única granja en la que el ordeño es totalmente manual, parece influir de manera determinante en la estructura de la comunidad de enterobacterias, la cual no muestra similitud con ninguna otra granja analizada (Capítulo II). Aún más, dicha granja fue la única en la que se aisló a *Photorhabdus luminescens*, y no presentó flujo genético de *E. coli* con el resto de granjas (Capítulo III).

**Tabla 1.** Cepas compartidas o exclusivas de grupos de granjas<sup>a</sup>.

Especies <sup>d</sup>	Grupo 1 <sup>b</sup>												Grupo 2																											
	G1 <sup>c</sup>				G7				G8				G3				G4				G5				G6				G2											
	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E	L	U	C	E				
E.f.	2																																							
S.f.	1	2	2	3	2	4	4	3	2	1	3	3	2	1	2	1					2	2	2	2					1	2	1	2								
E.cl.	1	1			1								1																1											
E.h.	1				1				1				1																											
E.cw.												1																1												
K.o.		1	1						1				1																											
B.r.	4	3	2	4	3	5	2	3	4	5			5				1				2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3								
P.l.																													3											
<i>E. coli</i>	4	4	6	6	4	2	3	6	4	4	1	10	2	7	11	8	10	10	10	10	8	7	4	4	6	8	5	8	5	8	5	9	5	9	9	196				
Patotipos	LT	2	3	4	2	1	3		1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	3	4	3	3	3	3	36				
ST																									1	1	1	1												
LT/ST																																								
EPEC																																								
EIEC																																								
Filogrupos	A	4	4	3	3	2	1	3	2	2	8	5	1	4	10	7	5	5	7	4	5	2	4	5	2	4	8	2	4	1	7	2	7	7	122					
B1					1							1	4				4			1	1				1						2	1			11					
B2					1																2	2	1		2	1					2	1			13					
D					1	1	1	1	1	1	1	2	3	1	4	1	3	1	4	1	3	1	2	1	2	3	1	2	3	1	1	3	2	2	34					

<sup>a</sup> Los dos grupos comparten personal y alimento, G2 no comparte estos elementos con otras granjas. <sup>b</sup> Se presenta el número de aislados de cada especie, patotipo y filogrupos por granja y por tipo de muestra. <sup>c</sup> Clave de muestras: L, leche; U, ubre; C, material de cama; E, excretas; T, total. <sup>d</sup> Clave de especies: E.f., *E. fergusonii*; S.f., *Shigella flexneri*; E.cl., *E. cloacae*; E.h., *E. hormaechei*; E.cw., *E. cowanii*; K.o., *K. oxytoca*; B.r., *B. rubrifaciens*; P.l., *P. luminescens*.

Derivado de los resultados del análisis socioeconómico (Capítulo I), del estudio de comunidades (Capítulo II), así como del flujo genético (Capítulo III) y presencia de patotipos de *E. coli* (Capítulo IV) de las granjas estudiadas, se sugiere un modelo descriptivo del ciclo de contaminación en las granjas de estudio, de acuerdo a las relaciones enumeradas anteriormente (Figura 2). En este modelo aparecen las rutas que siguen las especies de enterobacterias estudiadas y los porcentajes de incidencia de cada una de éstas. El modelo propuesto podrá irse optimizando conforme se genere nueva información de manejo y de bacterias asociadas a la contaminación de la leche en el ambiente de la granja. Por ejemplo, como se comentó anteriormente, el hallazgo de la especie fitopatógena *B. rubrifaciens* en excretas, sugiere la posibilidad de que exista un ciclo de contaminación que inicia con la introducción de alimento en las granjas, el cual ha sido abonado con excretas de los mismo animales. En estudios futuros sería interesante analizar cuáles de las especies patógenas de humano y ganado y/o patotipos de *E. coli* siguen este ciclo y pueden alcanzar la parcela, con el potencial de dispersión hacia otras áreas.



**Figura 2. Ciclo de contaminación y abundancia por tipo de muestra de las especies de enterobacterias aisladas de las granjas de estudio.** Las especies están listadas en orden decreciente de presencia. Los signos de interrogación indican fuentes no muestreadas y por lo tanto no tenemos información sobre las especies existentes. A, excretas; B, parcelas de cultivo; C, material de cama; D, ubre; E, manos de los ordeñadores y F, leche.

Una limitante del presente trabajo, es que no se obtuvieron aislados ni del personal de ordeña ni del alimento del ganado, lo cual haría más robustas las inferencias anteriormente expuestas respecto a la movilización de bacterias entre las granjas de estudio y dentro del ambiente de las granjas. Sin duda alguna, esto representa una tarea pendiente a realizar en próximos trabajos. También, es necesario realizar a futuro un análisis de correlación mediante el empleo de herramientas comunes en el estudio epidemiológico, como pruebas de chi cuadrada o correlación de Person, lo que permitiría dar soporte estadístico a las rutas y factores de dispersión aquí propuestos.

Del modelo propuesto, y partir del análisis realizado en el presente trabajo, es posible plantear una serie de propuestas iniciales para la disminución del riesgo de dispersión de enterobacterias patógenas entre granjas y dentro del ambiente de las granjas estudiadas.

Una primera serie de medidas generales aplicables a todas las granjas de las comunidades analizadas sería:

1. Instalaciones y equipo:

- i. en las granjas con piso de material firme, diseñar un programa de limpieza,
- ii. en las granjas con equipo de ordeña, desarrollar prácticas de aseo de las pezoneras y las mangueras de las ordeñadoras,
- iii. adecuar espacios para el guardado del alimento (forraje), evitando el contacto con excretas,
- iv. evaluar la posibilidad de emplear materiales de cama alternativos, por ejemplo, arena o viruta de madera.

2. Ganado:

- i. elaborar un programa de aseo de los animales de la granja, en particular de las vacas en producción,
- ii. diseñar acciones de manejo de animales enfermos (mastitis y otras enfermedades recurrentes) que permita evitar el contagio entre el ganado,



- iii. implementar un programa de manejo y tratamiento de excretas con la finalidad de evitar la acumulación dentro de la unidad de producción y disminuir el riesgo de dispersión de patógenos debido a su uso como abono (ver más adelante).

### 3. Ordeña:

- i. desarrollar prácticas adecuadas de higiene de ubre o pezón de las vacas antes de la ordeña,
- ii. usar una toalla de papel nueva para secar cada ubre (práctica observada solo en la granja G1),
- iii. establecer prácticas de aseo de los trabajadores de la granja, particularmente lavado adecuado de manos de los ordeñadores.

Una medida adicional, consistente en el lavado de la carreta en la cual se transportan las excretas a la parcela, sería importante antes de cargar el alimento de regreso a la granja, lo cual podría prevenir el ciclo de contaminación parcela granja propuesto anteriormente. En los casos de granjas que comparten personal de ordeña, los que posiblemente son vectores de intercambio, es importante realizar prácticas de higiene al realizar el cambio de granja, como un simple lavado adecuado de manos antes de salir de la granja donde se ordeña primero y antes de iniciar la ordeña en la siguiente granja. El trabajo de campo realizado mostró que ésta sencilla práctica comúnmente no se lleva a cabo.

En relación a la disminución del riesgo microbiológico por el uso de excretas como abono, varios tratamientos biológicos, químicos y físicos pueden promover la pérdida de viabilidad de patógenos, reduciendo significativamente los riesgos de las excretas animales (Gerba y Smith, 2005). Los ejemplos de tratamiento incluyen procesamiento bajo una amplia variedad de condiciones redox, composteo, lagunas aeróbicas, lagunas anóxicas y digestión anaeróbica para producir biogás (Larney *et al.*, 2003; Coté *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2007). Cada uno de estos procesos de tratamiento tiene sus ventajas y desventajas. La combinación de pH alto y producción de calor exotérmico hace de la estabilización con cal una buena opción de tratamiento químico (Maguire *et al.*, 2006). Los ejemplos de métodos físicos

incluyen separación de líquidos y sólidos, que puede ser acoplada con tratamiento biológico para remover nitrógeno y precipitación con cal para secuestrar fósforo (Vanotti *et al.*, 2005). En conjunto, la composición química y microbiológica de las excretas pueden variar de acuerdo al tiempo y método de guardado y al método de tratamiento (Bicudo y Goyal, 2003). Algunos de los factores que son importantes en la supervivencia de patógenos durante el tratamiento son la temperatura, el tipo de patógeno, el tiempo de contacto y el pH de las excretas (Sobsey *et al.*, 2002). Así, se hace necesario a futuro un estudio de factibilidad para evaluar cuál es el sistema óptimo de tratamiento de excretas de las granjas de estudio, de acuerdo a las características socioeconómicas de éstas, las características biológicas y químicas de las excretas, y el uso final del material tratado.

Evidentemente, aun pareciendo sencillas, la implementación de las prácticas anteriormente propuestas implican uso de recursos adicionales como el agua, o bien la inversión de tiempo que puede ser un factor importante para la comercialización oportuna de la leche, la cual tiene que ser distribuida el mismo día. A lo anterior habría que sumar los factores culturales de reticencia al cambio por el uso de las mismas prácticas quizá por varias generaciones. Estos y otros factores dificultan sin duda cualquier intención de cambio en los sistemas de producción estudiados, y la discusión de estos temas trasciende los objetivos del presente trabajo.

Es recomendable la estructuración de un programa permanente de evaluación de la calidad microbiológica de la leche obtenida, dirigido a la identificación de patógenos o patotipos específicos, con mayor relevancia en salud pública. En particular, derivado de los resultados de este trabajo se recomendaría hacer seguimiento a los patotipos ETEC, EPEC y EIEC dada su relevancia epidemiológica y la incidencia en las granjas estudiadas. En segundo, lugar el seguimiento de *S. flexneri* también dese ser considerado, dado el potencial de dicha especie para causar enfermedades aún en bajos números de carga. El uso de medios de cultivo selectivos y técnicas microbiológicas de identificación sería el adecuado en primera instancia, con la perspectiva de aplicar métodos de tipificación molecular rápidos, sensibles, específicos y de bajo costo. Sin embargo, es conveniente enfatizar que tanto esta propuesta como las realizadas anteriormente no están enfocadas a limitar

o inhibir la actividad productiva de las granjas de producción lechera a pequeña escala, y no deben de servir como pretexto para tal fin. Algunas de las propuestas enumeradas son relativamente sencillas de implementar y el sentido común podría ser suficiente para plantearlas, más allá de la generación de los datos aportados por el presente trabajo. No obstante, este estudio aporta datos objetivos que pueden sensibilizar a los productores y a las dependencias correspondientes, despertando así su interés en la implementación de prácticas que permitan disminuir los riesgos de salud pública y el mejoramiento de la calidad de la leche obtenida por sistemas de producción familiares que siguen siendo indispensables en la vida rural de Michoacán en particular, y de México en general.

## VII. CONCLUSIONES GENERALES

I. De acuerdo a la combinación de los resultados del análisis Blastn, DOTUR y UniFrac, la comunidad de enterobacterias cultivables de las granjas estudiadas es significativamente diversa.

II. Los resultados generados sugieren que la comunidad de enterobacterias cultivables es significativamente distinta en relación a los filotipos presentes entre grupos de granjas, pero no existen diferencias significativas en la distribución de individuos dentro de los filotipos encontrados en todas las granjas.

III. El 88% de las especies identificadas por Blastn son patógenos o potencialmente patógenos reportados para el hombre o los animales, por lo que la proporción es alta.

IV. Los patrones de agrupamiento de comunidades del análisis Unifrac, de flujo genético de *E. coli* y de distribución de patotipos de esta especie, aunado a los datos de prácticas de manejo de las granjas de estudio, sugieren que el intercambio de personal y alimento son factores de dispersión que influyen homogeneizando la estructura de la comunidad de enterobacterias cultivables entre las granjas que comparten dichos componentes del manejo.

## VIII. PERSPECTIVAS

I. Determinar la prevalencia de las especies de enterobacterias aisladas de las granjas de estudio a lo largo de un ciclo estacional. Esto permitiría conocer cuáles especies, patotipos y/o genotipos se encuentran de manera permanente en la granja y cuáles representan un riesgo estacional para la contaminación de la leche y la salud del ganado y los habitantes de las comunidades estudiadas.

II. Estudiar la comunidad de enterobacterias, y la población de *E. coli* en particular, de los ordeñadores, el personal de las granjas y de los habitantes en general de las comunidades estudiadas. La información generada a partir de dicho estudio permitiría mejorar el modelo de dispersión y contaminación de enterobacterias patógenas.

III. Analizar la comunidad de enterobacterias del suelo de las parcelas y del alimento. Al igual que en el caso anterior, serviría para mejorar el modelo del ciclo de dispersión propuesto. Además, permitiría evaluar la dispersión de bacterias hacia el entorno de las comunidades estudiadas.

IV. Realizar un estudio independiente de cultivo de la comunidad bacteriana en los distintos tipos de muestra analizadas a lo largo de un periodo estacional. El conocimiento básico sobre la estructura y la dinámica de la comunidad bacteriana no cultivable de las granjas lecheras puede contribuir a identificar patógenos potenciales y/o emergentes no detectados mediante los métodos de cultivo convencionales o que requieren de condiciones de seguridad estrictas para su manejo en el laboratorio (Nivel 2 o Nivel 3).

## IX. REFERENCIAS GENERALES

- Aitken M. D., Sobsey M. D., Van Abel N. A., Blauth K. E., Singleton D. R., Crunk P. L., Nichols C., Walters G. W., and Schneider M. 2007. **Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle.** *Water Research* 41:1659-1666.
- Bicudo J. R., and Goyal S. M. 2003. **Pathogens and manure management systems: a review.** *Environmental Technology* 24:115-130.
- Coté C., Massé D., and Quessy S. 2006. **Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries.** *Bioresource Technology* 97:686-691.
- Gerba C. P., and Smith Jr. J. E. 2005. **Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes.** *Journal of Environmental Quality* 34:42-48.
- Larney F. J., Yanke L. J., Miller J. J., and McAllister T. A. 2003. **Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure.** *Journal of Environmental Quality* 32:1508-1515.
- Maguire R. O., Hesterberg D., Gernat A., Anderson K., Wineland M., and Grimes J. 2006. **Liming poultry manures to decrease soluble phosphorus and suppress the bacteria population.** *Journal of Environmental Quality* 35:849-857.
- Sobsey M. D., Khati L. A., Hill V. R., Alocilja E., and Pillai S. 2002. **Pathogens in animal wastes and the impacts of waste management practices on their survival, transport and fate.** White Papers on Animal Agriculture and the Environment. National Center for Manure and Animal Waste Management.
- Vanotti M. B., Millner P. D., Hunt P. G., and Ellison A. Q. 2005. **Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment.** *Bioresource Technology* 96:209-214.