



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES
DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus aureus*
ASOCIADOS A HOSPEDEROS ESPECÍFICOS**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
EN LA OPCIÓN DE
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR AGROPECUARIA

Que presenta
MC. GERARDO URIEL BAUTISTA TRUJILLO

ASESOR
DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN-Doctor en ciencias en Biotecnología de
Plantas

COASESOR
DR. VICTOR BAIZABAL AGUIRRE-Doctor en ciencias en Biotecnología de
plantas

Morelia, Michoacán, México

Agosto 2014

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Juan José Valdez Alarcón. En la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de la coordinación de la investigación científica de la UMSNH (no. 14.7) y del CONACYT (CONACYT no. 56741).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres *Candi* y *Olivio* †, pues siempre me impulsaron para alcanzar mis pasiones en la vida. Por enseñarme sobre el conocimiento, perseverancia y actitud, herramientas para alcanzar cualquier objetivo.

A mi esposa Angélica, por impulsarme y creer en mí en todo momento, por estar a mi lado en los buenos y malos ratos, esta tesis y muchos más objetivos los construimos juntos.

Uriel Alexander, eras muy pequeño cuando escribí tu nombre en una tesis por primera vez, ahora sé que ya podrás leer estas líneas, gracias por tu paciencia y por entender que este trabajo era un gran reto, así como los retos que juntos afrontaremos en el futuro y que se podrás lograrlo.

He tenido la fortuna de contar con un gran equipo de trabajo experimental, **Walter, Mayra, Cinthia, Fanny, Vianney, Tania**. Agradezco su paciencia para alcanzar los objetivos clave de la investigación, por compartir éxitos y fracasos.

A los doctores **Alejandro Huante, Fco. Ramón, Alfredo Carmona, Gaspar, Daniela Ángel** y **Laura Melissa**, por su tiempo para enseñarme técnicas de experimentación claves, por hacer más divertidos los buenos y malos ratos, pero sobre todo por su apreciada amistad.

A la diosa **Atenea**, a los compañeros y amigos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, gracias por su amistad.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Para el **Dr. Juan José Valdez Alarcón**, Por compartir su idea que me dio las bases en mi Investigación, por permitirme formar parte de un excelente grupo de investigación y por facilitarme alcanzar objetivos en el plano nacional e internacional. Gracias por enterderme y aconsejarme.

A los miembros del comité tutorial.

Dr. Victor Manuel Baizabal Aguirre Co-director del proyecto de investigación, agradezco su insistencia y consejos para que este trabajo fuera algo de valor y por jamás permitirme el mínimo nivel de rendición.

Dr. Marcos Cajero Juárez, por su inigualable sentido del optimismo, reflejado en sus consejos y cooperación técnica para la realización de esta tesis.

A los Doctores, Ramón Arteaga Garibay y Jaime Amadeo Bustos Martínez, agradezco su disponibilidad y sugerencias que enriquecieron los objetivos del trabajo, pero sobre todo por su motivación para mi persona en los momentos de la pérdida del entusiasmo.

Al **Dr. Javier Oviedo Boyso** por sus amistad y consejos durante la realización de esta tesis.

Al **MVZ. Saúl Carranza German**, por su apoyo logístico durante el muestreo, a la Química **Irma Rentería Solórzano**, quien me brindo las facilidades en los experimentos bacteriológicos y al **Dr. José L. Solorio Rivera**, por su atinada sugerencia estadística, a todos gracias por su apoyo y consejos.

DEDICATORIA.

Dedico la presente tesis de doctorado a mi esposa Angélica, ha sido un camino largo, en el que disfrute a cada momento mi estancia, en la que logramos metas que enriquecieron mi vida profesional, fuiste un pilar en todo momento y juntos logramos este gran trabajo de tesis, con todo mi cariño.

También dedico esta tesis a mi hijo Uriel Alexander, a mi querido guerrero. Recuerda hijo, mis logros son dedicados para ustedes.

Gerardo Fernando, antes de tu primer año escribo para ti, ya que en algunos años podrás leerlo, me siento orgulloso de tu llegada a nuestras vidas y en un escrito tan importante, quería que compartieras el éxito y que recuerdes que el esfuerzo fue dedicado también para ti.

LISTA DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .	16
Table 2. Performance of culture media for the isolation of <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Table 3. Combined use of culture media and secondary test	32
Tabla 4. Antibióticos usados en el método de difusión en disco	41
Tabla 5. Primers usados en la técnica de PCR para detectar y caracterizar el gen <i>mecA</i> y <i>mecA_{LGA251}</i>	42
Tabla 6. Factores de riesgo biológico en casos de mastitis bovina en granjas de traspatio	44
Tabla 7. Frecuencia de Patrones de Resistencia de antibióticos β -lactámicos de especies de <i>Staphylococcus</i>	46
Tabla 8. Caracterización de fenotipos β -lactámicos multirresistentes de <i>S. aureus</i> , SCoN y SIG	48
Tabla 9. Primers usados en la técnica de PCR para amplificar adhesinas de <i>S. aureus</i>	65
Tabla 10. Análisis bioinformático de genes de adhesinas de <i>S. aureus</i>	67
Tabla 11. Identificación de Alotipos asociados a mastitis subclínica bovina (Regresión logística, $P < 0.05$) obtenidos usando diversos métodos de RFLP de adhesinas de <i>S. aureus</i>	68
Tabla 12. Índice de diversidad de Simpson v valores de concordancia entre métodos de RFLP de adhesinas usados para caracterizar 72 cepas de <i>S. aureus</i> aislados de mastitis bovina	70

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Relación de multiresistencia de especies del género <i>Staphylococcus</i> reistentes a Oxacilina. Oxa; Sensidisco de Oxacilina 1 µg, MIC; Concentración mínima inhibitoria, <i>mecA</i> ; gen de resistencia a meticilina, PVL; Leucotoxina de Phantom Valentine	51
Figura suplementaria 1. Relación de multiresistencia de especies del género <i>Staphylococcus</i> resistentes a Oxacilina. Grupo I, sensibles a todos los antibióticos; Grupo II, resistentes principalmente a VAN y NOV; grupo III, cepas resistentes a tres antibióticos principalmente PEN y AMP; grupos IV, V, VI y VII, resistentes a más de cinco diferentes tipos de antibióticos	52
Figura 2. Identificación de alotipos de adhesinas de <i>S. aureus</i> por RFLP. Panel A; FnbA, panel B; FnbB, panel C; ClfA, panel D; ClfB. Alotipo A de FnbA, alotipo G de FnbB, alotipo A de ClfA y alotipo A de ClfB, resultaron asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina	71
Figura 3. Identificación de alotipos de adhesinas de <i>S. aureus</i> por RFLP usando la combinación de FnbA, FnbB, ClfA, ClfB. Se observa el Alotipo X, el cual está asociado estadísticamente a mastitis subclínica bovina	72
Figura 4. Identificación de alotipos del gen <i>coa</i> de <i>S. aureus</i> por PCR-RFLP. Se observa el Alotipo I, el cual está asociado estadísticamente a mastitis subclínica bovina. Las cepas MRI222 y MRI194 se lograron discriminar usando PCR RFLP del gen <i>coa</i>	73

CONTENIDO

	Pagina
Lista de tablas	6
Lista de figuras	7
Resumen	10
Summary	11
I.- Introducción general	12
II.- Marco teórico	15
II.1. Importancia clínica de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
II.2. Virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
II.3. Adhesinas asociadas a pared celular también llamadas MSCRAMMs	18
III.-Hipótesis	21
IV.-Objetivo	21
IV.1. Objetivos específicos	21
V.- Performance of culture media for the isolation and identification of <i>Staphylococcus aureus</i> from bovine mastitis	22
Abstract	23
V.1. Introduction	23
V.2. Materials and Methods	25
V.2.1. Study design	25
V.2.2. Culture media, bacterial growth conditions and biochemical identification	26
V.2.3. Coagulase and β -hemolysis tests	27
V.2.4. Sequencing of the variable region 3 of the 16S rRNA (<i>rrs</i>) gene	27
V.2.5. Data and statistical analysis	27
V.3. Results	29
V.3.1. Performance of culture media	29
V.3.2. Combined use of culture media and secondary test	31
V.4. Discussion	32
VI.-Complejo de <i>Staphylococcus</i> spp. asociados a la mastitis bovina: factores de riesgo biológico y multirresistencia antimicrobiana	37
Resumen	37
VI.1. Introducción	37
VI.2. Material y Métodos	40
VI.2.1. Cepas bacterianas	40
VI.2.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	40
VI.2.3. Caracterización molecular e Identificación de genes	41
VI.2.4. Análisis Estadístico	42
VI.3. Resultados	43
VI.3.1. Factores de riesgo biológico	43
VI.3.2. Patrones de Resistencia de β -lactámicos en especies del género <i>Staphylococcus</i>	44
VI.3.3. Caracterización de fenotipos resistentes a β -lactámicos	46

VI.3.4. Análisis de similitud de los fenotipos multirresistentes en <i>Staphylococcus</i> spp., asociado a mastitis bovina	50
VI.4. Discusión	53
VI.5. Conclusiones	58
VII.- Polimorfismos de restricción en genes de adhesinas de aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> asociados a mastitis subclínica bovina	59
Resumen	59
VII.1. Introducción	59
VII.2. Materiales y Métodos	63
VII.2.1. Aislamiento e identificación de <i>S. aureus</i>	63
VII.2.2. Extracción de DNA genómico	63
VII.2.3. Análisis bioinformático de genes de adhesinas de <i>S. aureus</i>	64
VII.2.4. Construcción filogenética de los datos	64
VII.2.5. PCR-RFLP de adhesinas	65
VII.2.6. Análisis Estadístico y Evaluación del índice de discriminación	66
VII.3. Resultados	66
VII.3.1. Análisis bioinformático de genes de adhesinas de <i>S. aureus</i>	66
VII.3.2. Asociación estadística de los Patrones de restricción por PCR RFLP de los genes <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>clfA</i> y <i>clfB</i> de <i>S. aureus</i>	68
VII.3.3. Índice de discriminación de PCR RFLP de genes <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>clfA</i> y <i>clfB</i> de <i>S. aureus</i>	69
VII.3.4. Discusión	74
VII.3.5. Conclusión	76
VIII.-Discusión general	77
IX.- Conclusión general	80
X.- Referencias	81

RESUMEN

Las cepas de *Staphylococcus* spp. usadas en este trabajo se obtuvieron de casos de mastitis bovina de sistemas lecheros de traspatio. Se elaboró una base de datos dicotómicos, con la finalidad de determinar los factores de riesgo biológico y relación de multiresistencia entre cepas. Se analizó el polimorfismo de restricción y se estableció la asociación estadística entre los diferentes perfiles alélicos y la mastitis subclínica bovina, así como el índice de discriminación de PCR-RFLP de las adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB* de *S. aureus*. 440 aislados fueron obtenidos de Agar Sal y Manitol (SMA, Bioxon®), Agar *Staphylococcus*-110® (S110, Bioxon®), CHROMAgar *Staph Aureus*® (CSA, BD-BBL) y Agar sangre de carnero (SBA, BD-BBL). Todas las bacterias aisladas fueron identificadas por su morfología colonial típica en el medio respectivo, por pruebas secundarias (coagulasa y β -hemólisis) y por secuenciación parcial del gen del 16S rRNA (*rrs*) como la prueba de oro. SMA fue el medio de cultivo que mejor aisló e identificó *S. aureus* en casos de mastitis bovina seguido de S110, CSA y SBA, respectivamente. *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* y Grupo de *Staphylococcus intermedius* se asociaron como factores de riesgo biológico en casos de mastitis subclínica bovina. No fueron identificados los genes *mecA* y *mecA_{LGA251}* (*mecC*) en cepas de *S. aureus*, sin embargo, se detectó la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. sciuri* y SIG. Fue evidente la presencia de un complejo de *Staphylococcus* spp. relacionados epidemiológica y farmacológicamente a la mastitis subclínica bovina. El análisis de restricción de adhesinas de *S. aureus*, reveló que algunos alotipos de adhesinas se asociaron estadísticamente a mastitis subclínica bovina y usando PCR-RFLP con la combinación de cuatro adhesinas, se obtuvo el máximo valor del índice de discriminación. El método de PCR-RFLP usando la combinación de adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB*, fue el mejor para caracterizar *S. aureus*, lo que representa una alternativa como un método de caracterización molecular rápida, económica y versátil.

Palabras clave: *Staphylococcus*, Mastitis, Antimicrobianos, Polimorfismos.

SUMMARY

Strains of *Staphylococcus spp.* used in this work were obtained from cases of bovine mastitis in dairy backyard systems. Dichotomous data base, in order to determine the biological risk factors and relation of multi-resistance between strains was developed. Restriction polymorphism was analyzed and the statistical association between different allelic profiles and bovine subclinical mastitis, as well as the discrimination index of PCR-RFLP of adhesin genes *fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB* of *S. aureus*.

Four hundred and forty isolates were obtained using salt–mannitol agar (SMA, Bioxon), Staphylococcus-110 agar (S110, Bioxon), CHROMAgar Staph aureus (CSA, BD-BBL) and sheep's blood agar (SBA, BDBBL). All bacterial isolates were identified by their typical colony morphology in the respective media, by secondary tests (for coagulase and β -haemolysis) and by partial 16S rRNA (*rrs*) gene sequencing as a gold standard test. SMA was the culture medium that was best for isolating and identifying *S. aureus* from cases of bovine mastitis followed by S110, CSA and SBA. *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* and SIG were associated as risk factors biological in subclinical bovine mastitis cases. We do not identify *mecA* gene and *mecALGA₂₅₁* (*mecC*) gene in strains of *S. aureus*, however, we detected the presence of the *mecA* gene in strains of *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus* and SIG. It was evident the presence of a complex of *Staphylococcus spp.* related epidemiological and pharmacologically to bovine subclinical mastitis.

Analysis of restriction of adhesins of *S. aureus*, revealed that some cluster adhesins were statistically associated with bovine subclinical mastitis and using PCR-RFLP with a combination of four adhesins, was obtained the maximum value of the discrimination index.

The method of PCR-RFLP using the combination of adhesin genes *fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB*, was the best to characterize *S. aureus*, which represents an alternative as a method of fast, economical and versatile molecular characterization

Key words: Staphylococcus, Mastitis, Antimicrobial, Polymorphism

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.

Michoacán ocupa el decimosegundo lugar en la producción de leche de vaca a nivel nacional con 344,810 miles de litros (SIAP/SAGARPA, 2012). Uno de los sistemas lecheros que predominan en Michoacán (70 %) es el extensivo o mejor conocido como de traspatio y se caracterizan por ser poco tecnificadas, mantener entre 3-30 vacas, ordeño manual y poca higiene durante el ordeño. El mal manejo del sistema de producción láctea, hacen susceptible a los bovinos de enfermedades ocasionadas por bacterias difíciles de tratar, tal es el caso de la mastitis bovina. La mastitis bovina, el cual consiste en una inflamación de la glándula mamaria, impacta negativamente en la producción y calidad de la leche, ocasionando graves pérdidas económicas de los sistemas lecheros en todo el mundo (Saran y Chaffer, 2000).

Los microorganismos que provocan la mastitis bovina se clasifican en contagiosos y ambientales. Entre los microorganismos contagiosos y persistentes en la ubre de la vaca se encuentran *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus* spp. (Zadoks *et al.*, 2011). Los microorganismos ambientales son transmitidos por el contacto entre superficies contaminadas y la ubre de la vaca, entre estos se encuentran las bacterias del grupo coliforme, *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCoN) y el grupo intermedius (SIG) (Pyörälä S y Taponen S., 2009).

A pesar que existen mecanismos de control de la mastitis sugeridos por el Consejo Nacional de Mastitis de Estados Unidos de Norte América (National Mastitis Council, 1999), existe preocupación por la presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) y *Staphylococcus* no-*aureus* resistentes a metilicina (MRSCoN y MRSIG), así como *Staphylococcus* spp., resistentes a vancomicina, el cual son un indicador de la alarmante resistencia y multiresistencia hacia los fármacos antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento de la mastitis bovina. Existe evidencia de la transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles entre bacterias (Brody *et al.*, 2008; Hiramatsu *et al.*, 2013) y es la principal razón de la aparición de cepas más virulentas y resistentes a los antibióticos (Zaneveld *et al.*, 2008).

La virulencia de *Staphylococcus* spp., está determinada por su arsenal de toxinas, adhesinas, genes reguladores y condiciones ambientales (Miller *et al.*, 2008). En la superficie celular de *S. aureus* se localizan unas moléculas conocidas como adhesinas, estas se unen a proteínas del plasma y de la matriz extracelular que favorece a la bacteria para invadir células blanco (Garzoni and Kelley, 2008). Las adhesinas como las proteínas de unión a fibronéctina (FnbA y FnbB) favorecen la unión a fibrinógeno, elastina y fibronéctina (Fn) e invasión células de mamíferos, incluyendo células epiteliales, endoteliales y células fibroblásticas (Grundmeier *et al.*, 2004; Keane *et al.*, 2007; O'Neill *et al.*, 2008). Por otro lado, la adhesina ClfA es el principal factor de virulencia responsable de la aglutinación de *S. aureus* en plasma sanguíneo, en particular, ClfA es conocido por participar en el proceso de infección, facilitando la unión de la bacteria a través de inmovilizar o solubilizar fibrinógeno (Evagrio *et al.*, 2006; Ganesh *et al.*, 2008).

Las adhesinas y genes de virulencia se han empleado para la tipificación de bacterias. Existen métodos fenotípicos y genotípicos empleados para la tipificación epidemiológica de *S. aureus*. En todos ellos se buscan características importantes como tipibilidad, poder de discriminación, reproducibilidad, fácil uso e interpretación y bajo costo (Tenover *et al.*, 1994). Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) es un método que se caracteriza por el reconocimiento de secuencias específicas de ADN por enzimas de restricción, las cuales generan patrones de tipificación. PCR-RFLP de adhesinas *clfB* fue utilizado para la tipificación de *S. aureus* aislados de ovejas (Vaoutor *et al.*, 2005). PCR-RFLP usando el gen de coagulasa (*coa*) de *S. aureus* se ha empleado para la caracterización de *S. aureus* de origen Bovino (Karahan y Cetinkaya, 2007; Hata *et al.*, 2010), o para la caracterización de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Ishino *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta que las adhesinas están casi siempre presente en cepas de *S. aureus* (Fraunholz y Sinha, 2012) y que están sujetos a cambios puntuales en la estructura de los genes (McCarthy *et al.*, 2010), se hace interesante determinar los alelos de adhesinas en cepas de *S. aureus*, que sumando las características

fenotípicas y genotípicas de resistencia hacia los antibióticos, podría generar información importante ante la invasividad, competencia del nicho y respuesta inmunológica, pasos importantes para su internalización y/o patología de la bacteria (Henderson *et al.*, 2010). Además, la agrupación de alelos de adhesinas es una información ideal para ser utilizados como herramienta de tipificación de *S. aureus*.

En este estudio evaluamos primeramente la eficacia del agar de Sal y Manitol (SMA), Estafilococos 110 (S110), ChromAgar Stap aureus (CSA) y Agar Sangre (SBA) para aislar e identificar *S. aureus* y especies de *Staphylococcus* en casos de mastitis bovina. En segundo lugar nos interesó identificar las especies del género *Staphylococcus* asociadas significativamente a mastitis subclínica bovina, así como sus características de resistencia y/o multiresistencia hacia los antimicrobianos. Por último, se relacionaron estadísticamente los perfiles alélicos obtenidos con PCR-RFLP de las adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB* de *S. aureus* con la mastitis subclínica bovina y se determinó el índice de discriminación y coeficiente de correlación entre los métodos.

PCR-RFLP usando adhesinas, podría considerarse como un método para la genotipificación de *S. aureus*, discriminativo, reproducible, económico y rápido para laboratorios de escasos recursos. Además, los alelos identificados por PCR-RFLP de adhesinas, pueden ser candidatos ideales para estudios posteriores de patogénesis molecular y para la formulación de estrategias biotecnológicas para el control de enfermedades causadas por *S. aureus*.

II. MARCO TEORICO

II.1. Importancia clínica de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es capaz de causar enfermedades en humanos y animales. En humanos se relaciona con infecciones de la piel, infecciones alimentarias e infecciones invasoras nosocomiales como bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y síndrome de choque toxico (Velázquez Meza M., 2005; Bustos-Martínez *et al.*, 2006). Se ha identificado *S. aureus* como el mayor patógeno en infecciones intrahospitalarias, en la última década se han aislado cepas resistentes a meticilina (SARM) en todo el mundo, las cuales son importantes por su tolerancia a los antibióticos β -lactámicos. En años recientes la terapia para el tratamiento de infecciones provocadas por SARM se cambio por Vancomicina, resultando una alternativa favorable para el tratamiento de los casos clínicos. Sin embargo, en la actualidad se han presentado infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a Vancomicina (SARV) (Krishna TH y Ranjan SM, 2006; Ribak *et al.*, 2008; Musta *et al.*, 2009; Maor *et al.*, 2009.).

En la ganadería, *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos contagiosos prevalentes, y responsable de las infecciones clínicas y subclínicas de la glándula mamaria de vacas, borregas y chivas que desencadenan bajo rendimiento en la producción de leche (El Sayed, 2006).

II.2. Virulencia de *Staphylococcus aureus*

El cromosoma de *S. aureus* mide aproximadamente entre 2.8 a 2.9 Megabases (Mb) y se considera que contiene entre 2592 y 2748 genes. De acuerdo a la variabilidad genética del genoma se clasifican en genes basales (core genes), presentes en la mayoría de aislamientos y altamente conservados; los genes basal variables (core-variable genes) que se distribuyen ampliamente entre los aislamientos presentando una variabilidad considerable, cabe señalar que a este grupo de genes pertenecen la mayoría de los genes de virulencia. Por último, los genes que se encuentran asociados a elementos genéticos móviles, se dice que poseen la mayor variabilidad

(Lindsay *et al.*, 2004; Lindsay *et al.*, 2006 en Baizabal *et al.* 2009). Los genes de virulencia de *S. aureus* a través de la replicación, transcripción y traducción codifican para varios factores de virulencia que en función de su localización celular se clasifican en: asociados con la pared celular (proteínas celulares de superficie), extracelulares (exoproteínas) y genes reguladores (*agr*, *sar*), los cuales contribuyen a favorecer la patogenicidad de cada cepa de esta especie.

Los factores de virulencia (también conocidas como adhesinas) asociados con la pared celular incluyen los receptores de superficie con propiedades enlazantes para inmunoglobulinas, fibrinógeno, fibronectina, colágeno y varias otras proteínas externas (Tabla 1).

Las proteínas extracelulares secretadas por *S. aureus* comprenden, la variedad de enterotoxinas estafilococcicas (SE) de la A a la Q, las toxinas exfoliativas A (ETA) y B (ETB), la toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) y una potente Leucocidina conocida como Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL, Tabla 1).

Tabla 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

Determinante	Gen codificador	Función	Referencia
Adhesinas y Proteínas celulares de superficie			
Proteínas ricas en Ser-Asp	<i>sdrC, sdrD, sdrE</i>	Unión a matriz extracelular	Ikawaty 2008
Factores de agregación	<i>clfA, clfB</i>	Unión a matriz extracelular, aglutinante.	Herron-Olson <i>et al.</i> , 2007
Proteína de unión a fibronectina	<i>fnbA, fnbB</i>	Unión a matriz extracelular, enlazante a fibronectina	Herron-Olson <i>et al.</i> , 2007
Glicoproteína SBI	<i>sbi</i>	Antifagocítica	Haupt <i>et al.</i> , 2008
Adhesinas map	<i>map</i>	Adhesión e invasividad	Lawrence <i>et al.</i> , 2002
Proteína A	<i>spa</i>	Región de enlace IgG, proteína antifagocítica, activa la respuesta inflamatoria	Herron-Olson <i>et al.</i> , 2007
Hemolisinas alfa y beta	<i>hla, hlb</i>	Invasión tisular	Ohlsen <i>et al.</i> , 1998

Proteína EBPS	<i>ebps</i>	Proteína que enlaza a elastina	El-Sayed <i>et al.</i> , 2006
Proteínas de superficie de <i>S. aureus</i>	<i>sasA,B,D, E, F, H, I</i>	Unión a Fibronéctina y fibrinógeno	Hallin <i>et al.</i> , 2008
Proteínas de unión a matriz extracelular	<i>ebhA, ebhB</i>	Unión a matriz extracelular	Sinha y Herrmann, 2005
Precursor de la adhesina de colágeno	<i>cna</i>	Unión a colágeno	El-sayed <i>et al.</i> , 2006.
Proteínas de adhesión intercelular	<i>icaA, icaB, icaC, icaD</i>	Adhesión intercelular, formación de biopelículas	Nuryastuti <i>et al.</i> , 2009.
Proteínas membranales probables	<i>sab</i>		Herron-Olson <i>et al.</i> , 2007
coagulasa	<i>coa</i>	Coagulación del plasma sanguíneo	Habib Dastmalchi Saei, 2010
Proteínas Extracelulares			
Enterotoxinas	<i>seC, seD, seA, seE, seG, sel, seH</i>	Intoxicación alimentaria	Herron-Olson <i>et al.</i> , 2007
Proteínas EFB	<i>efb (fib)</i>	Adhesión e invasividad	Boden <i>et al.</i> , 1994
Toxina TSST-1	<i>tst</i>	Toxina de Choque toxico	Lindsay <i>et al.</i> , 2006
Leucocidina de Panton-Valentine	<i>lukS-PV, lukF-PV</i>		O'Hara <i>et al.</i> , 2008
Toxina exfoliativa	<i>etA, etB</i>	Síndrome estafilocócico en piel.	
Genes reguladores accesorios			
Loci global agr	<i>agr I, agr II</i>	Regulación de proteínas de virulencia	Boles y Horswill, 2008
Loci global sar	<i>sar</i>	Regulación de proteínas de virulencia	Chan y Foster, 1998
El sayed <i>et al.</i> 2006; Florence <i>et al.</i> 2006; Baizabal-Aguirre <i>et al.</i> 2009			

La familia de adhesinas asociadas a pared celular también llamadas MSCRAMMs (siglas en ingles “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”; componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz) son conocidas por que se unen a la matriz extracelular y

promueven la adherencia de la bacteria a las células del hospedador. A continuación se describen algunas adhesinas.

II.3. Adhesinas asociadas a pared celular también llamadas MSCRAMMs

Las proteínas de unión a fibronéctina (FnA y FnB) favorecen la unión a fibronéctina (Fn) e invasión células de mamíferos, incluyendo células epiteliales, endoteliales y células fibroblásticas. La adhesión se produce por la unión entre la proteína FnBPs y el receptor de fibronéctina ligando de la integrina $(\alpha_5)\beta_1$ (Grundmeier *et al.*, 2004). La Región N-terminal de FnBPA y FnBPB contiene una secuencia señal (S) seguida de un dominio A (subdominios N1, N2 y N3) con un 45 % en su identidad de aminoácidos en su secuencia que les permite unirse a fibrinógeno y elastina, seguido del dominio A se encuentra un motivo de unión a fibronéctina ordenado en tándem (95 % identidad de aminoácidos), en la región C-terminal se ubica un repetido rico en prolina (PRR) (O'Neill *et al.*, 2008; Burke *et al.*, 2010).

Covalentemente unido al peptidoglicano de la pared celular bacteriana, se encuentra una clase de proteínas conocida como factor aglutinante o de agregación también conocido como clumping factor A y B codificados por los genes *clfA* y *clfB*, son una familia de proteínas de superficie MSCRAMM que interactúan con la región C-terminal del fibrinógeno Fg (cadena- γ) y se caracterizan por la presencia de una región N-terminal seguida de una señal de secuencia y una región de unión a ligando A compuesta de tres dominios (N1, N2 y N3), el factor aglutinante posee un dominio de repetidos Serina-Aspartato (Región R) codificada por una repetición de ADN de 18 nucleótidos en los región 3' y una región C-terminal requerida para el anclaje a la pared celular como el motivo LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly). ClfA es el principal factor de virulencia responsable de la aglutinación de *S. aureus* en plasma sanguíneo, en particular, ClfA es conocido por participar en el proceso de infección, facilitando la unión de la bacteria a través de inmovilizar o solubilizar fibrinógeno. El fibrinógeno desempeña un papel importante en la formación de plaquetas, por último ClfA se ha implicado como factor de virulencia en un modelo de artritis séptica

en ratón y conejo, así como endocarditis infecciosa en ratón, (Sabat *et al.*, 2003; Evagrio *et al.*, 2006; Ganesh *et al.*, 2008).

Las proteínas de unión ricas en serina y aspartato son miembros del grupo MSCRAMM, son codificadas por los genes *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* arreglados en tandem de aproximadamente 2.8, 3.9 y 3.5 kbp respectivamente, localizados en el locus *sdr*. (Sabat *et al.*, 2006; Corrigan *et al.*, 2009). Las proteínas Sdr son miembros de las denominadas proteínas de superficie las cuales están caracterizadas por la presencia de una región R conteniendo varios dipeptidos serina-aspartato codificados por repetidos de DNA en la región 3' de los genes *sdr*. Las proteínas Sdr tienen una organización estructural comparable, un péptido señal es seguido por un dominio A el cual es similar en longitud entre los diferentes miembros del grupo. Sin embargo, no están muy homogéneos, ya que tienen de 20 a 30 % de identidad en residuos de aminoácidos, lo que sugiere que las proteínas Sdr juegan diferentes roles en el proceso patogénico de infecciones. Las proteínas Sdr tienen dos, tres o cinco secuencias de 110 a 113 residuos (motivos B) que están repetidos en tándem en SdrC, SdrE y SdrD, respectivamente. Los motivos B están seguidos por segmentos compuestos de repetidos SD (región R). La C-terminal (región M) de la proteína está involucrada en la estabilización de la proteína a la pared celular bacteriana. Las proteínas Sdr juegan un papel fundamental en la adherencia a células epiteliales y en un estudio se demostró la asociación entre la presencia de el gen *sdrD* y cepas de *S. aureus* meticilina resistente, además que esta proteína es crucial en la formación de abscesos (Sabat *et al.*, 2006; Corrigan *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2009; Barbu *et al.*, 2010; Sitkiewicz *et al.*, 2010).

Localizada en la capa externa del peptidoglucano esta la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA), una proteína asociada a pared celular presente en cantidades variables en distintas cepas, su reacción con los mecanismos del hospedador consiste en enlazarse con la terminal Fc de todas las inmunoglobulinas, excepto la IgG3. SpA se une a una gran repertorio inmunológico humano, expresado ya sea como receptor en células B o en forma soluble en Ig, lo que resulta en la disminución del sistema inmunológico. A la proteína SpA también se le ha atribuido la inducción de la inflamación en células de epitelio pulmonar por estimulación del

receptor al factor de necrosis tumoral α (Gómez *et al.*, 2005) y la modulación negativa de la fagocitosis de *S. aureus* (Baizabal *et al.*, 2009).

Las proteínas Efb anteriormente Fib, son proteínas extracelulares de *Staphylococcus aureus* de 19 KDa conocidas como proteínas de unión a fibrinógeno, si bien la mayoría de la proteína es extracelular existe una porción de la proteína asociada con la superficie celular. El análisis de secuencia reveló que la región N-terminal de Efb contiene dos regiones repetidas casi idénticas, las cuales tienen una homología parcial con cinco de siete repetidos de la C-terminal de coagulasa. La estructura de Efb muestra que la región C-terminal contiene un alfa-helix mientras que la región N-terminal tiene una estructura no ordenada. Se ha demostrado que sólo la región N-terminal se une a Fg (fibrinógeno) y sin el dominio de unión que existe en C-terminal. La combinación de Efb y Fg en cantidades equimolares conduce a la formación de un complejo Efb-Fg de precipitación in vitro. Esta precipitación es distinguible por la polimerización de fibrina mediada por coagulasa. Efb espontáneamente forma dímeros y esta dimerización puede contribuir a la formación del complejo de precipitación con Fg. Por último, en cepas de *Staphylococcus aureus* Efb negativo, la falta de Efb no afectó la capacidad de las bacterias a unirse a Fg. En otro modelo con ratones la falta de Efb no afectó la patogénesis de *S. aureus* en una endocarditis (Boden *et al.*, 1994; Oonagh Shannon and Jan-Ingmar Flock, 2004).

III. HIPOTESIS

Existen variantes alélicas de los genes de virulencia de *Staphylococcus aureus* relacionadas con la interacción con hospederos específicos (humano o bovino) y/o patología.

Además, estas variantes alélicas están relacionadas con determinadas características de virulencia del microorganismo en casos de mastitis bovina.

IV. OBJETIVOS

- Identificar polimorfismos de adhesinas de *Staphylococcus aureus* que pudieran asociarse a hospederos específicos (humanos y bovinos) y/o tipo de patología.

IV.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Aislar e Identificar molecularmente a las cepas aisladas.
- Determinar factores de riesgo asociados a mastitis bovina en las granjas muestreadas.
- Realizar la caracterización de perfiles de resistencia de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* spp.
- Realizar un análisis bioinformático para la elección de las adhesinas a evaluar.
- Analizar la presencia y distribución de variantes alélicas de las adhesinas presentes en las poblaciones analizadas.

V. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis.

Running title: Culture media for bovine *Staphylococcus aureus* isolation.

Contents category: Diagnostics, typing and identification

G. U. Bautista-Trujillo¹, J. L. Solorio-Rivera², I. Rentería-Solorzáno², S. I. Carranza-Germán², J. A. Bustos-Martínez³, R. I. Arteaga-Garibay⁴, V. M. Baizabal-Aguirre¹, M. Cajero-Juárez^{1,5}, A. Bravo-Patiño¹, and J. J. Valdez-Alarcón^{1*}.

¹ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, ² Unidad de Servicios de Apoyo al Diagnóstico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, and ⁵ Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

³ Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

⁴ Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

* Corresponding author: J.J. Valdez-Alarcón. 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 s/n, Posta Veterinaria. C.P.58893, La Palma, Tarímbaro, Michoacán. México. Tel/Fax: +52-443-2958029. E-mail: jjvaldez_a@hotmail.com; jjvaldez@umich.mx.

ABSTRACT

Rapid isolation and identification of pathogens is a major goal of diagnostic microbiology. In order to isolate and identify *Staphylococcus aureus* a number of authors have used a variety of selective and/or differential culture media. However, to date there are no reports comparing the efficacy of selective and differential culture media for *S. aureus* isolation from bovine mastitis cases using the 16S rRNA (*rrs*) gene sequence as a gold standard test. In this work we evaluated the efficacy of four selective and/or differential culture media for the isolation of *S. aureus* from milk samples collected from cows suffering bovine mastitis. 440 isolates were obtained from Salt-Manitol Agar (SMA, Bioxon®), Staphylococcus-110® Agar (S110, Bioxon®), CHROMAgar Staph Aureus® (CSA, BD-BBL) or Sheep Blood Agar (SBA, BD-BBL). All bacterial isolates were identified by their typical colonial morphology in the respective media, by secondary tests (coagulase and β -hemolysis) and by partial 16S rRNA (*rrs*) gene sequencing as a gold standard test. Sensitivity, positive predictive and negative predictive values were higher for SMA (86.96, 52.63 and 95.95% respectively) compared with S110 (70.00, 23.73 and 90.91% respectively), CSA (69.23, 28.13 and 95.74% respectively) and SBA (68.75, 37.93 and 89.58% respectively) while specificity was similar for all media. Data indicated that the use of culture media for *S. aureus* isolation combined with coagulase and hemolysis determination as secondary tests improved accuracy of the identification and concordance with the *rrs* gene sequence-analysis with respect to the use of the culture media alone.

Keywords: Selective and differential culture media, *Staphylococcus aureus*, bovine, mastitis.

V.1. INTRODUCTION

The importance of *Staphylococcus aureus* as a successful pathogen resides in its wide genetic diversity and host range, and the different pathologies associated with the infection. *S. aureus* is associated with Hospital-Acquired (HA) and Community-

Acquired infections as well as with human carriers (Miller & Diep, 2008) or Livestock Associated (LA) infections (Graveland *et al.*, 2011), for which methicillin-resistant (MRSA) or methicillin-sensitive (MSSA) isolates are important (Hata *et al.*, 2010). In this study we were interested in the identification of *S. aureus* isolates associated with bovine mastitis in backyard farms. This production system is prevalent in rural milk production in México and constitutes a major economic income source for the owners (Sánchez & Solorio, 2004). Primary isolation and presumptive identification of the pathogen is crucial for microbiological diagnosis and epidemiological surveillance. In order to isolate and identify *S. aureus* a number of authors have used a variety of selective and/or differential culture media. Among the most common media used are Salt-Manitol Agar (SMA) and Staphylococcus-110 Agar (S110), which are selective and differential media that take advantage of the *S. aureus* tolerance to 7.5% NaCl as well as its metabolic activities such as manitol fermentation in SMA or gelatinase activity in S110. Sheep Blood Agar (SBA) is a rich medium in which the β -hemolytic activity of *S. aureus* isolates may be clearly differentiated (Brown, 1919). Baird-Parker Agar that is a moderately selective and differential medium which is used to detect telurite tolerance and lecithinase activity of *S. aureus* (Baird-Parker, 1962); incubation for up to 48 hours is required prior to identification of the specific colony morphology. For this medium the incubation time is a great disadvantage for the rapid identification of *S. aureus*.

The United States National Mastitis Council (NMC) in 1999 suggested the use of SBA for the isolation of bovine mastitis pathogens and the presumptive identification of *S. aureus*. This proposal was later supported by Boerlin *et al.* (2003) who combined the detection of hemolytic and coagulase activities of *S. aureus* isolates to increase the sensitivity and specificity of the microbiological identification up to 99.4% and 100.0%, respectively. This approach has been successfully used for the isolation and primary identification of *S. aureus* isolates from food and human clinical samples. Recently, alternative selective and differential culture media such as CHROMAgar Staph.Aureus (CHROMagar Microbiology; BD-BBL) and CHROMAgar MRSA (BD-BBL), Chrom ID (bioMérieux), MRSA Select (BioRad) and Brilliance MRSA (Oxoid), all of them based on the use of specific chromogenic substrates,

were developed for the isolation of *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), from clinical samples (Boyce & Havill, 2008; Gaillot *et al.*, 2000; Nahimana *et al.*, 2006). CHROMAgar Staph. Aureus showed high sensitivity (95.5%) and specificity (99.4%) for the identification of *S. aureus* isolated from human clinical samples and has been widely used in clinical (Perry & Freydière, 2007) food (Ritter *et al.*, 2009) and animal microbiology analysis (Wang *et al.*, 2008).

To date there are no reports comparing the performance of selective and differential culture media for *S. aureus* isolation from bovine mastitis. Besides, comparison of the performance of selective/differential culture media has not been validated using partial sequencing of 16S ribosomal RNA (*rrs*) gene as a gold standard test. *rrs* gene sequence is a powerful tool for the precise and rapid identification of bacterial pathogens that has been used as a gold standard test for the validation of ID32 Staph and Vitek identification systems based on phenotypic profiles (Becker *et al.*, 2004). Therefore, in this work we have evaluated the efficacy of SMA, S110, BD-BBL CHROMagar Staph aureus (CSA) and BD-BBL SBA for the rapid primary identification of bovine *S. aureus* isolated from cows living in backyard farms from the central region of the State of Michoacán in México.

V.2. MATERIALS AND METHODS

V.2.1. Study design

Sample collection was performed according to a random model of proportional distribution (Espinoza *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2004a; Sánchez & Solorio, 2004) with which a representative number of farms to be sampled in each locality was calculated as a function of the prevalence of bovine mastitis per farm in the region (65%), considering a confidence level of 95% and a precision of 10%. Sampling by conglomerates was performed into each selected farm. Samples were collected from winter 2010 (February) to autumn 2011 (September). Sixteen backyard farms were selected based on the following features that are typical of backyard, non-technified dairy milk production systems: 6 to 30 cows in each herd feeding with seasonal

forages; manual milking; poor hygiene conditions; manpower are members of the family and the main income represents the sale of milk in villages nearby the backyard farms. Milk samples (c.a. 25 ml) were collected and evaluated for the presence of subclinical mastitis with the California Mastitis Test (CMT, Rice, 1997). Samples scoring from 1+ to 4+ for CMT were considered as positive in the absence of signs of udder inflammation (Bhutto *et al.*, 2012). 144 quarters from 96 cows were positive to the CMT. When clear signs of udder inflammation and reduction in milk quality were observed, samples were considered as positive for clinical mastitis. All samples were stored on ice for transportation. Upon arrival to the lab, each of the milk samples were simultaneously inoculated in all the four tested culture media with cotton swabs soaked in the sample. A routine of soaking and inoculation was established in order to reduce variations due to sample loading.

V.2.2. Culture media, bacterial growth conditions and biochemical identification

SMA and S110 from Bioxon were prepared following the manufacturer instructions. CSA and SBA plates were purchased from BD-BBL. Inoculated plates were incubated aerobically at 37°C for 18 to 24 h. Criteria for the identification of *S. aureus* in the selective or differential culture media were in accordance to the colonial morphology expected for each culture medium as follows: 1) for SMA, whitish to yellow colonies that changed the color of phenol red to yellow, indicating mannitol fermentation; 2) for S110, cream-colored to golden or yellow colonies having or not an halo of gelatin hydrolysis and positive to mannitol fermentation after bromothymol blue addition; 3) for CSA, mauve colonies; 4) for SBA, whitish to yellow colonies presenting the typical clear halo of β -hemolysis. *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 (an isolate of bovine origin) and NCTC 8325 (an isolate of human origin) were used as reference strains. All colonies were subcultured in the rich medium Luria-Bertani Agar (LBA) to ensure their purity before further identification tests were performed and for short term storage. Identification of *S. aureus* and other staphylococci was performed by the following tests: morphology in Gram staining, catalase activity, mannitol fermentation, gelatin hydrolysis, mixed sugar fermentation

by methyl red test, Voges-Proskauer for acetoin production, coagulase and β -hemolysis. The level of contamination was calculated as the percentage of samples in which fungi or yeasts were found in SBA (Ericsson *et al.* 2009).

V.2.3. Coagulase and β -hemolysis tests

Coagulase and β -hemolysis activities were determined in all the 440 colonies irrespective of the culture medium where they were isolated, their identification by biochemical tests or final identification by *rrs* gene sequence analysis. Coagulase activity was determined with BBL Coagulase Plasma Rabbit kit (BD-BBL) following the supplier instructions and considering a final reading after 24 h of incubation with the plasma. β -hemolytic activity was determined in SBA plates (BD-BBL).

V.2.4. Sequencing of the variable region 3 of the 16S rRNA (*rrs*) gene

To confirm the identity of all the 440 bacterial isolates, sequencing of the variable region 3 of the 16S rRNA (*rrs*) gene was performed (Lee *et al.*, 1996) and was considered as the gold standard test for the identification of the isolates. Sequencing was performed at the Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, Irapuato, México). Similarity searches were performed with the BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The partial rRNA gene sequences analyzed in this work have been deposited in the GenBank database with accession numbers JQ511370 to JQ511809. Sequences with similarity values of 98% or higher were considered to belong to the same species (Stackebrandt & Goebel, 1994; Staley, 2006).

V.2.5. Data and statistical analysis

To evaluate the ability of the tested culture medium to isolate *S. aureus*, frequency of isolation (FI) was analyzed. FI was calculated as the total number of *S. aureus*

(true positives and false negatives) confirmed by *rrs* gene sequencing, divided by the total number of isolates (n). To evaluate their ability to correctly identify *S. aureus*, comparison of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) was performed. For culture media comparison (Table 2), positive criteria for each isolate were defined as the identification of colonial morphology as follows. True positives (Tp) were considered those isolates correctly identified from colony morphology and *rrs* gene sequence analysis. False positives (Fp) were only suggestive of *S. aureus* by colonial morphology. True negatives (Tn) were considered negative for both culture-based and molecular identification approaches. False negatives (Fn) were negative in culture medium but positive to *rrs* gene sequence analysis. For combined phenotypic identification of *S. aureus* isolates using colonial morphology in the tested culture media in combination with the presence of coagulase and hemolytic activities as confirmatory tests (Table 3). Positive criteria for each isolate was considered as the expected colonial morphology in the respective culture medium tested and positive coagulation of plasma and β -hemolysis in SBA, both after 24 h incubation. Tp fulfill positive criteria in the phenotypic tests and positive identification with the *rrs* gene sequence analysis. Fp fulfill the positive criteria in the phenotypic test but not the *rrs* gene sequence analysis. Tn did not fulfill neither of the two criteria. Fn did not fulfill positivity to phenotypic evaluation but were positive to the *rrs* gene sequence analysis. Efficacy of the medium to isolate *S. aureus* was calculated as the frequency of isolation (FI) of *S. aureus* in each media, and was calculated as $FI = ((Tp + Fn) / n) * 100$, where n is the total number of isolates. Sensitivity (St) was calculated as $St = (Tp / (Tp + Fn)) * 100$. Specificity (Sp) was calculated as $Sp = (Tn / (Tn + Fp)) * 100$. Positive predictive value (PPV) was calculated as $PPV = (Tp / (Tp + Fp)) * 100$. Negative predictive value was calculated as $NPV = (Tn / (Tn + Fn)) * 100$.

The concordance between the identification of isolates in the selective/differential culture media and the *rrs* gene sequencing was estimated with the *kappa* index of concordance (Landis & Koch, 1977). Differences in sensitivity and specificity values between the different culture media were tested for statistical significance using a logistic regression analysis. The statistical software package Egret v. 2.0.3.1. (Cytel)

was used. Confidence interval (CI) limits were set to 95%. Comparisons for statistic calculations were performed against SMA in Table 1 or against SMA + coagulase + β hemolysis as they were the medium or the combination of medium plus secondary tests with the best performance. Statistically significant differences were calculated after comparing treatment proportions with the Yates' correction of the χ^2 , using the MedCalc® software v12.3.0.0 (MedCalc Software bvba). A $P < 0.05$ was considered statistically significant. Agreement between the two identification approaches was considered in accordance to *kappa* index values as follows (Landis & Koch, 1977): 0, no agreement; 0-0.2, non significant; 0.2-0.4, low; 0.4-0.6, moderate; 0.6-0.8, good; 0.8-1.0, very good.

V.3. RESULTS

V.3.1. Performance of culture media

Prevalences of subclinical and clinical mastitis were 60.41% (58/96) and 4.16% (4/96), respectively. Seventy two out of 440 isolates grown on the different culture media tested were confirmed to be *S. aureus* by the *rrs* gene sequence analysis. Total number of isolates in each medium is shown in Table 2. The total number of isolates was lower for SBA than for the other media because of the concomitant isolation of bacteria showing extensive growth or filamentous fungi which in some cases did not allow us to properly describe the colonial morphology or to isolate the colony, so only colonies that were clearly isolated were considered for this study. Considering all of the culture media tested *S. aureus* was the species most frequently identified (16.36%), while the following species were detected with less frequencies: *S. epidermidis* (8.41%), *S. haemolyticus* (7.05%), *S. equorum* (6.36%), *S. xylosus* (5.91%), *S. saprophyticus* (5.91%), *S. sciuri* (4.77%), *S. succinus* (4.09%), *S. hominis* (3.64%), *S. intermedius* group (2.50%), *Staphylococcus devriesei* (2.05%) and other species of the genus *Staphylococcus* (12.51%). Bacteria different from the genus *Staphylococcus* were also isolated in these culture media and were found with the following frequencies: *Aerococcus viridans* (2.27%),

Bacillus pumilus (1.59%), *Bacillus subtilis* (1.36%), *Arthrobacter sulfureus* (1.36%), *Aerococcus urinaeequi* (1.14%), *Bacillus cereus* (0.91%), *Paenibacillus macquariensis* (0.91%) and others (10.91%). The level of contamination of our samples was 13.0%.

The evaluation of the efficacy of culture medium to isolate *S. aureus* is shown in Table 2. Since SBA is a rich, non-selective culture medium, it is considered as the golden standard for *S. aureus* isolation (NMC, 1999). Frequency of isolation (FI) of *S. aureus* was similar for SMA and SBA and was lower for S110 and CSA. CSA was the only one that showed a statistically significant difference against SMA ($P=0.0467$). The ability of each medium to correctly identify *S. aureus* isolates, was also analyzed. Sensitivity and specificity were determined for each culture media (Table 2). SMA showed the highest sensitivity to detect *S. aureus* compared with the other culture media (Table 2). S110, CSA and SBA showed similar but low sensitivity values. The four media tested showed similar specificity values, with SBA having a slightly lower value than the other media. To further evaluate the ability of the culture media to discriminate for *S. aureus* or other species, positive and negative predictive values, as well as the *kappa* index of concordance were calculated (Table 2). Higher PPVs were obtained for SMA and SBA compared with the values calculated for S110 and CSA. NPVs were similar among the four culture media tested. Agreement between the use of selective media and the *rrs* gene sequence analysis (gold standard test) was determined by calculating the *kappa* index of concordance. The *kappa* index value for SMA and CSA resulted in moderate agreement with the *rrs* gene sequencing, SBA and S110 showed a low agreement. Global concordance between the four culture media tested in this study resulted in a global *kappa* index of 0.49, which indicates a moderate agreement among them.

Table 2. Performance of culture media for the isolation of *Staphylococcus aureus*.

Tp, true positives; Fn, false negatives; Tn, true negatives; Fp, false positives; FI, frequency of isolation; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Culture medium	Tp	Fn	Tn	Fp	% FI (95 % CI)	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)	PPV (%)	NPV (%)	Kappa
SMA (n=112)	20	3	71	18	20.53 (18.46–22.54)	86.96 (85.24–88.68)	79.78 (72.59–86.90)	52.63	95.95	0.63
S110 (n=125)	14	6	82	23	16.00 (14.31–17.69)	70.00* (68.28–71.72)	78.14 (70.95–85.33)	23.73	90.91	0.30
CSA (n=126)	9	4	90	23	10.32* (9.24–11.38)	69.23* (67.51–70.95)	79.65 (72.46–86.84)	28.13	95.74	0.59
SBA (n=77)	11	5	43	18	20.78 (18.76–22.84)	68.75* (67.03–70.47)	70.49 (63.30–77.68)	37.93	89.58	0.45

*Statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with SMA.

V.3.2. Combined use of culture media and secondary test

As the use of differential and/or selective culture media for the isolation and primary identification of *S. aureus* isolates is not enough to ensure the identity of the isolates, a secondary test is needed to precisely identify the isolates as *S. aureus*. Determinations of coagulase and β -hemolysin activities are easy and affordable confirmatory techniques to identify *S. aureus*. When one or both of these confirmatory tests were used in combination with each selective medium, they improved the ability to correctly identify *S. aureus* isolates (Table 3). For SBA, only the combination with coagulase test was presented because the criterion of β -hemolysis has been already considered in the positive colony morphology description, although β -hemolysis was confirmed again after primary isolation. All isolates were β -hemolytic. The use of coagulase at 24 h as secondary test of identification improved sensitivity, specificity, PPV and NPV in combination with the respective culture medium. However, SMA and coagulase showed higher values of sensitivity and PPV compared with the other culture media. Using β -hemolysis as secondary test of identification also increased sensitivity, specificity and PPV when combined with the respective culture medium. However, most media had low PPV values, thus increasing the probability to accept false positives.

Using both coagulase and β -hemolysis as secondary tests of identification of *S. aureus* increased sensitivity, specificity, VPP and VPN of the identification when

combined with the respective culture medium, mainly in SMA for which all calculated values reached 100% and maximum concordance with *rrs* gene sequencing.

As an identification process, the use of the selective/differential media in combination with both secondary tests, determination of coagulase and hemolytic activities, render the best values for the *kappa* index of concordance against the gold standard test, *rrs* gene sequencing.

Table 3. Combined use of culture media and secondary test.

Tp, true positives; Fn, false negatives; Tn, true negatives; Fp, false positives; FI, frequency of isolation; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Culture medium + confirmatory tests	Tp	Fn	Tn	Fp	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)	PPV (%)	NPV (%)	kappa
SMA + Positive coagulase 24 h (n=112)	23	0	86	3	100 (97.58–100)	96.63 (91.25–100)	88.46	100	0.98
SMA + β -haemolysis (n=112)	21	2	84	5	91.3* (88.88–93.72)	94.38 (89.00–99.76)	80.77	97.67	0.87
SMA + Positive coagulase 24 h + β -haemolysis (n=112)	23	0	89	0	100 (97.58–100)	100 (94.62–100)	100	100	1.00
S110 + Positive coagulase 24 h (n=125)	18	2	97	8	90.00* (87.58–92.42)	92.38 (87.00–97.76)	69.23	97.98	0.84
S110 + β -haemolysis (n=125)	13	7	103	2	65.00* (62.58–67.42)	98.10 (92.72–100)	86.67	93.64	0.85
S110 + Positive coagulase 24 h + β -haemolysis (n=125)	19	1	105	0	95.00* (92.58–100)	100 (92.64–100)	100	99.06	0.98
CSA + Positive coagulase 24 h (n=126)	12	1	106	7	92.31* (89.89–94.73)	93.81 (88.43–99.19)	63.16	99.07	0.87
CSA + β -haemolysis (n=126)	10	3	98	15	76.92* (74.50–79.34)	86.73* (81.35–92.11)	40.00	97.03	0.72
CSA + Positive coagulase 24 h + β -haemolysis (n=126)	12	1	109	4	92.31* (89.89–94.76)	96.46 (91.08–100)	75.00	99.09	0.92
SBA + Positive coagulase 24 h (n=77)	14	2	55	6	87.50* (85.08–89.92)	90.16 (84.78–95.54)	70.00	96.49	0.79

*Statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with SMA + coagulase + β haemolysis.

V.4. DISCUSSION

Validation on the use of selective and/or differential culture media for the primary isolation and presumptive identification of *S. aureus* has been reported previously (Han *et al.*, 2007; Kateete *et al.*, 2010; Ollis *et al.*, 1995). In all of these reports commercially available series of biochemical tests or immunological methods have been used as gold standard tests for the identification of *S. aureus*.

Previous publications have reported better sensitivities for CSA in samples of human origin than for other culture media, in opposition to our observations. Specificity and

sensitivity values were close to 100% (Boyce & Havill., 2008; Carricajo *et al.*, 2001; Gaillot *et al.*, 2000; Kateete *et al.*, 2010; Perry *et al.*, 2003; Perry & Freydière, 2007). In these reports, the gold standard tests for the identification of *S. aureus* were based on biochemical tests (API ID 32 Staph System, VITEK 2 ID-GP), hybridization probes (Accuprobe) or real-time PCR (BD Gene Ohm MRSA). Becker *et al.* (2004) showed that identification tests commonly used for *S. aureus* and other staphylococci that are based on biochemical tests such as ID 32 Staph and VITEK 2 failed to correctly identify 23.6% and 34.5% of isolates, respectively. CSA was originally designed and tested for the isolation of *S. aureus* from human clinical samples and have been used for bovine milk samples from cows affected with mastitis (Wang *et al.*, 2008). Those isolates were further identified with an *S. aureus* specific PCR assay (Martineau *et al.*, 1998).

When this report was in preparation we got notice that a selective chromogenic medium (CHROMAgar Mastitis GP; bioMérieux) would be recently available for the isolation of bovine mastitis Gram-positive pathogens. The principle for the identification of *S. aureus* in this new medium seems to be the same as that of CSA since criteria for identification of *S. aureus*-related colonies are the same for both media. It would be interesting to independently evaluate the performance of this new chromogenic medium for the presumptive identification of mastitis pathogens, but using a highly precise gold standard test for *S. aureus* identification based on gene sequence analysis.

An alternative to phenotypic identification of isolates are the molecular approaches. An example of these approaches is the PCR-mediated identification of the ubiquitous *tuf* gene encoding elongation factor Tu (EF-Tu), which has been widely used in combination with species specific probe hybridization for the precise identification of *S. aureus* (Martineau *et al.*, 2001). Recently Pletinckx *et al.* (2012) compared chromogenic media with different salt concentrations to isolate methicillin resistant *S. aureus* from diverse anatomical sampling sites in pigs. Sensitivity (85.5%) value was similar for ChromID MRSA (bioMérieux) than that reported in this work for CSA (86.96%), but lower than that reported by Gaillot *et al.* (2000) for human samples (95.5%). The gold standard test for *S. aureus* identification in Pletinckx's report was

a multiplex PCR assay for the detection of an *rrs* gene region specific for *S. aureus*, the *mecA* gene related to methicillin resistance and the *nuc* gene encoding the thermonuclease. Combined real time–PCR detection of relevant genes may behave as a better gold standard test than biochemically-based identification tests thus explaining the reduced sensitivity values for ChromID MRSA.

The difference in effectiveness estimated for SBA and coagulase test between Boerlin's (2003) and this report resides again in the use of ID 32 STAPH kit or *rrs* gene sequence analysis as golden standard tests for the identification of *S. aureus*. Boerlin *et al.* also used *rrs* sequence analysis but only to confirm doubtful *S. aureus* identifications. Genetic polymorphisms in surface virulence factors encoding genes such as *spa*, *clfA* and *fnbA* have been detected in association with the lack of ability of Staphaurex test to identify *S. aureus* from bovine origin (Stuts *et al.*, 2011). This also suggest that identification of *S. aureus* based on relevant surface antigens may not be sufficient for proper identification of isolates.

A major advantage of *rrs* or other gene sequencing approaches is that a particular isolate may be correctly identified despite variations in its phenotypic behavior. Sequencing of *rrs* gene has been validated for the identification of known species of the genus *Staphylococcus* (Takahashi & Kikuchi, 1999). *rrs* sequence is not able to discriminate among *S. intermedius* group-related species (Ghebremedhin *et al.*, 2008), but it was able to discriminate *S. aureus* from other species of the genus. *rrs* gene sequencing isn't also able to discriminate among *S. aureus* and *S. simiae*. However, both species are easily distinguishable because *S. simiae* is negative to the coagulase test and have been isolated only from chimpanzees (Pantucek *et al.*, 2005).

An essential complementation of the use of a selective or differential culture media for primary isolation in the veterinary microbiology laboratory is the use of a secondary test that helps to identify the presumptive *S. aureus* isolates. Due to its low cost and simplicity, coagulase activity and hemolysis have been extensively used to identify *S. aureus* isolates. When both of these tests were combined to identify the isolates obtained in SMA, concordance *kappa* index raised to 1.0, suggesting a very good agreement with *rrs* sequencing. These data are in

accordance to those reported by Boerlin *et al.* (2003) for which sensitivity and specificity values raised close to 100% when both hemolysis and coagulase (at 4h) were used as identification tests for *S. aureus* from bovine origin. Our samples were inoculated in plates using cotton swabs soaked in the milk samples, which may introduce variation in the number of isolates obtained in each culture medium. Despite of this, significant differences among culture media performance were detected by the statistical analysis. Also, there is coincidence of our sensitivity values with previous reports using other molecular approaches. SBA as a rich medium may also allow the isolation of microbial species that contaminate the samples. For bovine mastitis diagnosis it is widely recognized that the teat channel hosts a large amount of microbes, thus presenting high contamination levels if compared with human clinical samples (Braem *et al.* 2012; Zadoks *et al.*, 2011). Ericsson *et al.* (2009) described 4.5% of sample contamination while Persson *et al.*, (2011) described 18%. Our sample contamination level (13%) is between these values. Differences in the level of contamination may be attributed to the particular production system and hygiene practices in the farms under study.

In summary, due to its efficacy to isolate *S. aureus*, its sensitivity, specificity and predictive values, alone or in combination with secondary identification tests and by its concordance with *rrs* gene sequence analysis SMA was the culture medium that better isolated and identified *S. aureus* from cases of bovine mastitis followed by S110, CSA and SBA, respectively. Further evaluation of bacterial isolation or identification strategies such as new chromogenic media or biochemical tests, should consider the use of *rrs* or other gene sequence analysis as a better standard for a proper and robust validation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported with grants from Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (No. 14.7) and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 56741), México to J.J.V.A. G.U.B.T. is supported with a scholarship for PhD studies from CONACYT-México. Authors are indebted to J.L.C. Bedolla-Cedeño, R. Mejía-Alfaro and M.M.

Cardoso-Cardoso for helpful assistance in sampling collection and microbial identification, and to owners of the farms who kindly agreed to participate in this study.

The authors declare no conflict of interests.

VI. Complejo de *Staphylococcus* spp. asociados a la mastitis bovina: factores de riesgo biológico y multirresistencia antimicrobiana.

RESUMEN.

En el presente estudio se identificaron las especies de *Staphylococcus* asociados significativamente a la mastitis subclínica bovina y se establecieron grupos de similitud en función de los patrones de resistencia hacia los antibióticos. Las cepas de *Staphylococcus* spp., usadas en este trabajo se obtuvieron de casos de mastitis bovina de sistemas lecheros de traspatio. Se elaboró una base de datos dicotómicos usando el registro de casos de mastitis subclínica bovina y la identificación molecular de la bacteria, con la finalidad de determinar los factores de riesgo biológico y relación de multiresistencia entre cepas. *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* y SIG se asociaron como factores de riesgo biológico en casos de mastitis subclínica bovina. No se detectó la presencia de los genes *mecA* y *mecA_{LGA251}* (*mecC*) en cepas de *S. aureus* resistentes a concentraciones altas de oxacilina, sin embargo, se detectó la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. sciuri* y SIG. Se identificaron cepas BORSA, MRSCoN y MRSIG multirresistentes a diversas familias de antibióticos. Los datos de este trabajo ponen en evidencia la presencia de un complejo de *Staphylococcus* spp., relacionados epidemiológica y farmacológicamente a la mastitis subclínica bovina.

VI.1. INTRODUCCIÓN.

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos patógenos más estudiados. Es causante del Síndrome del Shock tóxico, del envenenamiento por alimentos y de lesiones en la piel y tejidos blandos de humanos en comunidad (Herron-Olson *et al.*, 2007). Además, es el agente causal principal de septicemia y muerte de neonatos en hospitales (El-Mahdy *et al.*, 2014). También es el causante de mastitis subclínica y clínica en ganado lechero (Contreras y Rodríguez, 2011). Sin embargo, se han

descrito otros patógenos responsables de la mastitis bovina y según su comportamiento epidemiológico se han clasificado en contagiosos (aquellos transmitidos por las acciones relacionadas con el ordeño de la leche) y ambientales (patógenos adquiridos del entorno) (Pyörälä y Taponen, 2009; Zadoks *et al.*, 2011). En años recientes se ha puesto interés en el grupo de *Staphylococcus* Coagulasa negativo (SCoN) y el grupo de *Staphylococcus intermedius* (SIG), los cuales se cree que podrían estar interactuando frecuentemente con *S. aureus* (Huber *et al.*, 2011). Actualmente SCoN y SIG son llamados patógenos emergentes de la mastitis, debido a su persistencia en el nicho (Pyörälä y Taponen, 2009), presencia de toxinas, genes de virulencia y multirresistencia hacia los antibióticos (Ünal y Doğu, 2012). Se han reportado diferentes especies de *Staphylococcus* en mastitis subclínica bovina, en la mayoría de los casos los microorganismos más comunes fueron *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans* y *S. sciuri* (Gillespie *et al.*, 2009; Sampimon *et al.*, 2009; Contreras y Rodríguez, 2011; Persson *et al.*, 2011; Braem *et al.*, 2012; Piessens *et al.*, 2012).

Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y *Staphylococcus* no-*aureus* resistentes a meticilina (MRSCoN y MRSIG), así como *Staphylococcus* spp. resistentes a vancomicina, son un indicador de la alarmante resistencia y multiresistencia hacia los fármacos antimicrobianos, lo que dificulta el tratamiento de infecciones bacterianas. Existe evidencia de la transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles entre bacterias (Brody *et al.*, 2008; Hiramatsu *et al.*, 2013) y es la principal razón de la aparición de cepas más virulentas y resistentes a los antibióticos (Zaneveld *et al.*, 2008). Un ejemplo de movilidad genética es la presencia de islas genómicas en *S. aureus*, principalmente la “isla de resistencia móvil” *SaRI* la cual se cree que fue adquirida por transferencia horizontal y porta el gen *fusB* que confiere resistencia al ácido fusídico (O’Neill *et al.*, 2007). *Staphylococcus haemolyticus* es la bacteria que presenta más secuencias de inserción (IS) en su genoma. Interesantemente *Staphylococcus epidermidis* meticilina resistente (MRSE RP62A) contiene la *IS256* y *S. epidermidis* susceptible a oxacilina (MSSE ATCC12228) no la posee en el genoma (Hiramatsu *et al.*, 2013).

La resistencia a los antibióticos β -lactámicos (β -LAC) y específicamente a Oxacilina (OXA) en especies de *Staphylococcus*, se debe principalmente al gen *mecA* localizado en un elemento genético móvil conocido como Staphylococcal chromosome cassette (*SCCmec*), que también puede contener otros genes de resistencia a aminoglucósidos o macrólidos y de los que se conocen hasta ahora al menos 11 variantes del *SCCmec* que contienen 6 complejos *mec* diferentes (http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html). Recientemente se ha descrito homólogos del gen *mecA* conocidos como *mecB* y *mecC* en humanos y animales, lo que sugiere una constante evolución de las bacterias resistentes a meticilina (García *et al.*, 2011; Unnerstad *et al.*, 2013).

A pesar que existen mecanismos de control de la mastitis sugeridos por el Consejo Nacional de Mastitis de Estados Unidos de Norte América (National Mastitis Council, 1999), los investigadores mantienen el esfuerzo hacia el estudio de los patógenos más importantes de manera individual. Es importante generar información sobre la influencia e interacción del grupo de microorganismos asociados a la mastitis bovina, para el mayor éxito de estrategias de control. La importancia de estudiar un grupo de microorganismos relacionados con la mastitis bovina, es la pauta para comprender más sobre su interacción genética y la capacidad infecciosa a nivel colectivo. Además, es la base para conocer su potencial en la transferencia de genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos, su asociación con hospederos humanos y animales, con la finalidad de conocer más acerca del potencial zoonótico o antropozoonótico de los mismos. Es por ello que en este estudio nos interesó identificar las especies del género *Staphylococcus* asociadas significativamente a mastitis subclínica bovina, así como sus características de resistencia y/o multiresistencia hacia los antimicrobianos.

VI.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

VI.2.1. Cepas bacterianas.

Las cepas de *Staphylococcus* y otros géneros bacterianos usadas en este trabajo se obtuvieron de casos de mastitis subclínica bovina de sistemas lecheros de traspatio en los municipios de Tarímbaro y Álvaro Obregón colindantes con la ciudad de Morelia, capital del Estado de Michoacán de Ocampo en México. La identificación de los aislados fue determinada por su morfología en medio de Agar Sal y Manitol, así como con las pruebas de actividad de coagulasa y β -hemólisis y confirmadas posteriormente mediante la secuenciación parcial de la región variable 3 ARNr 16S (*rrs*, Lee *et al.*, 1996). Las secuencias parciales del gen *rrs* se encuentran depositadas en la base de datos del GenBank con números de acceso JQ511370-JQ511809 (Bautista *et al.*, 2013).

VI.2.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

La evaluación del fenotipo de resistencia antimicrobiana se llevó a cabo con el método de difusión en disco de acuerdo con la guía contenida en el documento M100-S19 de la 19th información suplementaria del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2009). Se usaron sensidiscos (Becton & Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) de distintas familias de fármacos comúnmente usados y se muestran en la Tabla 4. Se consideraron los valores de punto de corte recomendados por CLSI y las consideraciones particulares para cada tipo de microorganismo (Feßler *et al.*, 2010).

La concentración mínima inhibitoria de oxacilina se evaluó en un intervalo de concentraciones de 1 a 6000 $\mu\text{g/mL}$ (OxaMIC). El ensayo de resistencia a Vancomicina en placa de agar, se determinó según los valores de punto de corte indicados en CLSI (CLSI, 2009). Una vez determinados los valores de resistencia se procedió a calcular porcentajes de distribución de las resistencias en función a la especie.

Tabla 4. Antibióticos usados en el método de difusión en disco

Símbolo de la clase de antibiótico	Clase de antibiótico	símbolo de antibiótico	Tipo de antibiótico
AMC	Aminocumarina	NB30	Novobiocina 30 µg
		NB5	Novobiocina 5 µg
AMG	Aminoglucosido	GM	Gentamicina 10 µg
β-LAC	β-Lactámicos (Cefalosporina)	P	Penicilina 10 IU/IE/UI
		AM	Ampicilina 10 µg
		OXA	Oxacilina 1 µg
		FOX	Cefoxitina 30 µg
		CF	Cefalotina 30 µg
CLF	Cloranfenicol	C	Cloranfenicol 30 µg
FLU	Fluoroquinolonas	CIP	Ciprofloxacino 5 µg
GLP	Glicopeptido	VA30	Vancomicina 30 µg
		VA5	Vancomicina 5 µg
LIN	Lincosamidas	CC	Clindamicina 2 µg
		L	Lincomicina 2 µg
MAC	Macrolido	E	Eritromicina 15 µg
OZD	Oxazolidinonas	LZD	Linezolida 30 µg
EST	Estreptograminas	SYM	Quinupristin/Dalfopristin 15 µg
RIF	Rifamicinas	RA	Rifampicina 5 µg
SUL	Sulfonamida	SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprima 1.25 µg
TET	Tetraciclinas	TE	Tetraciclinas 30 µg

VI.2.3. Caracterización molecular e Identificación de genes.

El ADN genómico de los aislados de *S. aureus* fue obtenido incubando una suspensión bacteriana con 100 µl de buffer TEN (30 mM TRIS-HCl pH 8; 5 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl) y 32 µL de la enzima lisostafina (50 mg/L), 10 µL lisozima (1 g/L) y 20 µl de Proteinasa K (20 mg/mL 10 mM Tris-HCl pH 8). El producto obtenido fue purificado por centrifugación primeramente con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), seguido de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) saturado con Tris-HCl 0.1 M pH 8 y por último con Isopropanol. El producto de ADN obtenido fue suspendido en buffer de Tris-HCl 1M (pH8) y EDTA 0.5 M para su conservación (Protocolo modificado; Fitzgerald *et al.*, 1997).

La detección de los genes para la caracterización de las especies de *Staphylococcus* oxacilina-resistente, se llevó a cabo a través de la técnica de

reacción en cadena polimerasa (PCR), los primers usados en este trabajo se enlistan en la Tabla 5. La concentración de cloruro de magnesio, buffer de fosfatos, desoxinucleótidos y protocolo de amplificación se llevó a cabo según la descripción de los autores. Todos las cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina fueron tipificados con *spa*-typing (Kahl *et al.*, 2005) y multilocus sequence typing (MLST, Enright *et al.*, 2000). Los tipos de alelos y las secuencias tipo fueron obtenidos en las bases de datos Ridom SpaServer (<http://www.spaserver.ridom.de>) y para MLST (<http://www.mlst.net>) respectivamente.

Tabla 5. Primers usados en la técnica de PCR para detectar y caracterizar el gen *mecA* y *mecA_{LGA251}*.

Nombre del primer	Gene	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
<i>mecA</i> P4	<i>mecA</i>	TccAgATTAcAAcTTcAccAgg	162	Oliveira y Lencastre, 2002.
<i>mecA</i> P7		ccAcTTcATATcTTgTAAcg		
<i>mecI</i> -P2	<i>mecI</i>	ATcAAgAcTTgcATTcAggc	209	Oliveira y Lencastre, 2002
<i>mecI</i> -P3		gcfgTTTcAATTcAcTTgTc		
<i>mecA_{LGA251}</i> FP	<i>mecA_{LGA251}</i>	TcAccAggTTcAAcYcAAAA	356	Garcia <i>et al.</i> , 2011
<i>mecA_{LGA251}</i> RP		ccTgAATcWgcTAATAATATTTc		
<i>mecA_{LGA251}</i> F	<i>mecA_{LGA251}</i>	gcTccTAATgcTAATgcA	304	Cuny <i>et al.</i> , 2011
<i>mecA_{LGA251}</i> R		TAAgcAATAATgAcTAcc		
<i>mecA</i> F	<i>mecA</i>	cTTTgCTAgAgTAgCACTCg	750	Donación Dr. Bustos Martinez
<i>mecA</i> R		gCTAgCCATTCCCTTTATCTTg		
<i>ccrA</i> F1	<i>ccrA</i>	YccWAAyTAYTgTggYcgTgT	296	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
<i>ccrA</i> R1		TKYTKgTgcRTTKATNccT		
<i>ccrB</i> F1	<i>ccrB</i>	cgWYTRgcWmgWAAyAcHTc	496	Oliveira <i>et al.</i> , 2006
<i>ccrB</i> R1		cTTTTcgWcKYTTWTcRYTcc		
<i>blaZ</i> F	<i>blaZ</i>	AgTcgTgTTAgcgTTgATATTA	809	Garcia <i>et al.</i> , 2011
<i>blaZ</i> R		cAATTTcAgcAAccTcAcTTAcTA		
<i>spa</i> -1113f	<i>Spa</i>	TAAAgACgATccTTcggTgAgc	variable	Kahl <i>et al.</i> , 2005
<i>spa</i> -1514r		cAgcAgTAgTgccgTTTgcTT		
Luk-PV-1	<i>pvl</i>	ATcATTAggTAAAATgTcTggAcATgATccA	433	Lina <i>et al.</i> , 1999
Luk-PV-2		gcATcAASTgTATTggATAgcAAAAgc		

VI.2.4. Análisis Estadístico.

Se elaboró una base de datos usando un modelo dicotómico de caracteres fenotípicos o genotípicos (1=presencia, 0=ausencia) en una hoja de Excel. Los datos fueron evaluados con la prueba de chi cuadrada (χ^2) usando la corrección de Fisher-exacto para muestras pequeñas ($N \leq 20$) y la corrección de Yates para

muestras grandes, ambos métodos de corrección se usaron solo en los caso de celdas con muestras menores de 5 en las tablas de contingencia de 2x2. Debido a que la mastitis bovina es una afección de etiología multifactorial, las variables con un valor de $P < 0.22$ fueron considerados con asociación a la enfermedad. Con la finalidad de evaluar estadísticamente la intensidad de la asociación, las variables con valores de $P < 0.22$ en la prueba de χ^2 se analizaron bajo un análisis de regresión logística, las variables con un valor de $P < 0.05$ fueron considerados como factores de riesgo biológico. Se utilizó el paquete estadístico del software Egret v. 2.0.3.1 (Cytel). El intervalo de confianza fue del 95 %.

El grafico de similitud utilizando los perfiles de multiresistencia se construyó usando también un modelo dicotómico (1=resistente, 0=sensible) en hoja de Excel. Datos binarios fueron usados para la elaboración de una matriz de distancia/similitud utilizando el algoritmo de Nei y Li/Dice, con una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones), por último se construyó un cladograma de similitud para determinar grupos o cluster de asociación en relación con la resistencia hacia los antibióticos. Se utilizaron el software FreeTree versión 0.9.1. 50 (Pavlíček *et al.*, 1999) y TreeViewX versión 0.5.0 (Page, 1996).

VI.3. RESULTADOS.

VI.3.1. Factores de riesgo biológico

En un estudio previo determinamos la prevalencia de mastitis subclínica y clínica bovina en la región con valores de 61.41 (58/96) y 4.16% (4/96) respectivamente. Además, reportamos la frecuencia de *S. aureus* (16.36 %) y especies de *Staphylococcus* spp. como: *S. epidermidis* (8.41 %), *S. haemolyticus* (7.05 %), *S. equorum* (6.36 %), *S. xylosus* (5.91 %), *S. saprophyticus* (5.91 %), *S. sciuri* (4.77 %), *S. succinus* (4.09 %), *S. hominis* (3.64 %), *S. intermedius* group (2.50 %), *S. devriesei* (2.05 %) y otras especies del genero *Staphylococcus* (12.51 %) en casos de mastitis subclínica bovina (Bautista *et al.*, 2013).

Basándonos en esos resultados, analizamos la posible asociación de las diferentes especies de *Staphylococcus* con la mastitis subclínica bovina. Las especies de

Staphylococcus que mostraron significancia estadística en su asociación con la mastitis subclínica bovina se muestran en la Tabla 6. *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* y SIG, se asociaron estadísticamente con la mastitis subclínica bovina, *S. aureus* presentó la mayor asociación. Determinamos también la razón de momios, la cual se refiere al factor de riesgo de padecer la enfermedad en individuos expuestos comparados con los no expuestos (Tabla 6). *S. aureus* mostró una alta razón de momios (47.52) respecto a las demás especies.

Tabla 6. Factores de riesgo biológico en casos de mastitis bovina en granjas de traspatio.

Especie	n	OR	95 % IC (OR)	Coef.	S.E	Z-	P-Value
<i>S. aureus</i>	72	47.52	6.09-370.52	3.8612	1.0479	3.6848	0.0002*
<i>S. haemolyticus</i>	32	17.53	2.23-137.65	2.8644	1.0512	2.7248	0.0064*
<i>S. saprophyticus</i>	22	11.45	2.05-91.31	2.4384	1.0591	2.3022	0.0213*
<i>S. sciuri</i>	21	12.55	1.73-99.70	2.5304	1.0571	2.3937	0.0167*
<i>S. epidermidis</i>	37	11.5	2.51-52.52	2.4423	0.7750	3.1515	0.0016*
<i>S. hominis</i>	14	8.42	1.03-68.29	2.1313	1.0677	1.9962	0.0459*
<i>S. xylosus</i>	26	6.6	1.43-30.97	1.8971	0.7837	2.4208	0.0155*
SIG	17	11.5	4.51-52.52	2.4384	0.7700	3.1019	0.0477*
<i>S. equorum</i>	25	4.56	0.95-21.72	1.5185	0.7959	1.9078	0.0564

*Asociación estadística significativa con la mastitis subclínica bovina ($P < 0.05$): n: número de cepas; OR: Razón de momios; IC: Intervalo de confianza de Razón de momios; Coef: valor del coeficiente; S.E: Error standar; Z: punto de corte; P-value: valor de p .

VI.3.2. Patrones de Resistencia de β -lactámicos en especies del género *Staphylococcus*

Una de las características importantes de la virulencia del género *Staphylococcus* es su capacidad para resistir la acción de compuestos antimicrobianos. Los resultados de la evaluación de la resistencia a beta-lactámicos de 241 cepas de

especies de *Staphylococcus* asociadas estadísticamente a mastitis subclínica bovina y presencia de los genes *mecA* y *pvl* se muestran en la Tabla 7.

Todas las cepas (100 %) de *S. hominis* presentaron resistencia al sensidisco de Penicilina y Ampicilina comparado con las demás especies, sin embargo, el porcentaje de resistencia hacia P y AM fue alto en la mayoría de las especies (rangos de 54.55 % a 86.11 %). La población de *S. xylosus* fue más sensible a P y AM con 34.62 % y 19.23 % de resistencia respectivamente. Cuarenta cinco cepas de especies de *Staphylococcus* (18.67%) asociadas a la mastitis subclínica bovina fueron resistentes a oxacilina por la prueba en disco, el mayor porcentaje de cepas resistentes se presentó en SIG (33.33%) seguido de *S. hominis* (28.57%) y *S. aureus* (26.39 %). La prueba de resistencia a Cefoxitina en disco se emplea para corroborar la resistencia de oxacilina, el mayor número de cepas resistentes a Cefoxitina se presentó en *S. sciuri* (42.86 %) seguido de *S. hominis* (35.71 %) y SIG (27.78 %). Se evaluaron otros antibióticos como el sensidisco de Vancomicina (5 µg/mL y 30 µg/mL), en este caso los porcentajes de resistencia de VA5 y VA30 fueron altos en *S. aureus* (98.28 % y 77.78 % respectivamente), sin embargo, no ocurrió crecimiento en el ensayo en agar con vancomicina. El porcentaje de cepas resistentes al sensidisco de Gentamicina fue alto en *S. sciuri* (9.52 %) seguido por *S. hominis* (7.14 %), *S. haemolyticus* (6.25 %) y *S. epidermidis* (5.41 %) comparado con SIG (0 %) y *S. aureus* (2.78 %). La resistencia al sensidisco de lincomicina fue alta en cepas de *S. sciuri* (76.19 %) seguido de *S. aureus* (69.44 %), *S. hominis* (64.29 %) y *S. epidermidis* (62.12 %) comparado con *S. haemolyticus* (43.75 %) y SIG (44.44 %).

Por otro lado, la concentración mínima inhibitoria a oxacilina (OxaMIC) varió ampliamente entre los rangos de 2 y 6000 µg/mL. El análisis reveló el mayor número de cepas resistentes a concentraciones de oxacilina por encima del punto de corte (≥ 4 µg/mL) en *S. hominis* (21.42%), seguido de *S. aureus* (12.50%).

Las especies de *Staphylococcus* resistentes a β -lactámicos que amplificaron el gen *mecA* se muestran en la Tabla 7. Todas las cepas evaluadas de *S. aureus* fueron negativas a la presencia del gen *mecA*. Sin embargo, fue posible amplificar el gen

mecA en *S. hominis* (7.14%) en *S. haemolyticus* (6.25%), SIG (5.88%), *S. sciuri* (4.76%) y *S. xylosus* (3.84%). En ninguna de las especies de *Staphylococcus* analizadas en este trabajo se presentó el gen *mecA*_{LGA251}.

Se evaluó la presencia del gen *pvl* en especies de *Staphylococcus* como un marcador de virulencia en comunidad y movilidad genética. SIG presentó el mayor porcentaje de cepas portadoras del gen *pvl* (23.52 %) comparado con *S. aureus* (15.27 %), *S. hominis* (14.28 %), *S. epidermidis* (8.10 %), *S. saprophyticus* (4.54 %), *S. xylosus* (3.84 %) y *S. haemolyticus* (3.12 %). No se detectó el gen *pvl* en ninguna cepa de *S. sciuri* (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de Patrones de Resistencia de antibióticos β -lactámicos de especies de *Staphylococcus*.

Nombre (número de cepas)	Prueba de difusión en disco				MIC Oxacilina No. (%)	<i>mecA</i> No. (%)	<i>pvl</i> No. (%)
	No. de Cepas Resistentes (%)						
	P	AM	OXA	FOX			
<i>S. aureus</i> (n=72)	62 (86.11)	56 (77.78)	19 (26.39)	15 (20.83)	9 (12.50)	0 (0)	11 (15.27)
<i>S. haemolyticus</i> (32)	23 (75)	22 (71.88)	2 (6.25)	2 (6.25)	2 (6.25)	2 (6.25)	1 (3.12)
<i>S. saprophyticus</i> (22)	11 (54.55)	8 (36.36)	4 (18.18)	6 (22.73)	3 (13.63)	0 (0)	1 (4.54)
<i>S. sciuri</i> (21)	16 (76.19)	16 (76.19)	3 (14.29)	8 (42.86)	2 (9.52)	1 (4.76)	0 (0)
<i>S. epidermidis</i> (37)	31 (83.78)	29 (78.38)	6 (16.22)	6 (16.22)	2 (5.40)	0 (0)	3 (8.10)
<i>S. hominis</i> (14)	14 (100)	14 (100)	4 (28.57)	6 (35.71)	3 (21.42)	1 (7.14)	2 (14.28)
<i>S. xylosus</i> (26)	9 (34.62)	5 (19.23)	2 (7.69)	3 (11.54)	2 (7.69)	1 (3.84)	1 (3.84)
SIG (17)	14 (82.35)	14 (82.35)	5 (29.41)	4 (23.52)	1 (5.88)	1 (5.88)	4 (23.52)

VI.3.3. Caracterización de fenotipos resistentes a β -lactámicos

En la Tabla 8 se agruparon las cepas de *Staphylococcus* resistentes al oxacilina por la prueba de sensibilidad en disco y se analizó su multiresistencia, concentración mínima inhibitoria a oxacilina (OxaMIC), y presencia de los genes *mecA* y *pvl*. Todas las cepas de *S. aureus* resistentes a Oxacilina presentaron multiresistencia a más de 5 clases de antibióticos. *S. aureus* (MRI192) resistió a 11 clases de antibióticos (β LAC-GLP-AMC-LIN-TET-OZD-EST-RIF-SUL-MAC-FLU). 10 cepas de SCoN y 4

de SIG fueron resistentes a 5 o más clases de antibióticos. *S. xylosus* (MRI550) fue el único aislado que resistió 9 clases de antibióticos (β LAC-GLP-AMC-LIN-AMG-TET-CLF-EST-RIF), contrariamente, *S. haemolyticus* (MRI241 y MRI401), *S. saprophyticus* (MRI596), *S. epidermidis* (MRI501 y MRI560), *S. hominis* (MRI534, MRI539, MRI540 y MRI588) y SIG (MRI455, MRI456, MRI507 y MRI612) resistieron entre 5 y 8 distintas clases de antibióticos (Tabla 8). Nueve aislados de *S. aureus* superaron el valor de punto de corte ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$) de resistencia en la prueba de la concentración mínima inhibitoria a oxacilina (OxaMIC), dos cepas de *S. aureus* resistieron concentraciones altas de oxacilina de 4000 $\mu\text{g/mL}$ (MRI359) y 250 $\mu\text{g/mL}$ (MRI372) comparado con los cepas *S. aureus* MRI218, MRI223, MRI356, MRI361, MRI370, MRI371 y MRI374 que resistieron 8 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina cada uno, ninguna de estas cepas presentó los genes *mecA* o *mecA*_{LGA251}. Se logró amplificar el gen *mecA* solo en el control positivo (*S. aureus* 43300). 14 cepas SCoN y una SIG resistieron concentraciones por arriba de 4 $\mu\text{g/mL}$ de oxacilina. *S. epidermidis* (MRI560) fue el aislado que resistió la mayor concentración de oxacilina (6000 $\mu\text{g/mL}$) seguido de 3 cepas de *S. saprophyticus* y 2 *S. hominis* que resistieron hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$ en cada caso (Tabla 8). Se logró amplificar el gen *mecA* en 5 aislado SCoN y 1 cepa de SIG: 2 cepas de *S. haemolyticus* (MRI241 y MRI401), 1 *S. sciuri* (MRI493), 1 *S. hominis* (MRI534), 1 *S. xylosus* (MRI 465) y 1 SIG (MRI456). Por otro lado, los cepas de *S. aureus* (MRI197, MRI223, MRI354 y MRI372), *S. haemolyticus* (MRI401), *S. saprophyticus* (MRI596), *S. epidermidis* (MRI324, MRI501 y MRI560), *S. hominis* (MRI534) y SIG (MRI455, MRI456, MRI507 y MRI612) amplificaron el gen *pvl*.

Los resultados presentados evidencian la presencia de cepas identificados como *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente o borderline (BORSA), *Staphylococcus* coagulasa-negativos meticilina resistente (MRSCoN) y SIG meticilina resistente (MRSIG) en granjas de traspatio. Las cepas de *S. haemolyticus* (MRI401), *S. hominis* (MRI534) y SIG (MRI456) se caracterizaron por su capacidad de multiresistencia, soportar altas concentraciones de oxacilina y presencia del gen *mecA*, por lo que pueden ser clasificadas como MRSCoN y MRSIG respectivamente y amplificar el gen *pvl*.

Tabla 8. Caracterización de fenotipos β -lactámicos multirresistentes de *S. aureus*, SCoN y SIG.

ID Cepa	Especies	Prueba de difusión de disco en agar diámetro de la zona(mm)				MIC	Gen			
		(No de clases de antibióticos.) Patrón de resistencia	Penicilina Punto de corte (≤ 28 mm)	Ampicilina Punto de corte (≤ 28 mm)	Cefoxitina Punto de corte (≤ 24 mm)		Oxacilina Punto de corte (≤ 10 mm)	Rango Oxacilina Punto de corte (≥ 4 μ g/mL)	<i>mecA</i>	<i>pvl</i>
MRI192	<i>S. aureus</i>	11	β LAC-GLP-AMC-LIN-TET-OZD-EST-RIF-SUL-MAC-FLU	0	7	17	0	0	-	-
MRI223	<i>S. aureus</i>	10	β LAC-GLP-AMC-LIN-AMG-TET-OZD-EST-MAC-FLU	7	8	26	9	2-8	-	+
MRI376	<i>S. aureus</i>	10	β LAC-GLP-AMC-LIN-OZD-EST-RIF-SUL-MAC-FLU	0	0	14	0	0-2	-	-
MRI216	<i>S. aureus</i>	9	β LAC-GLP-LIN-TET-OZD-EST-RIF-SUL-FLU	0	7	17	0	0	-	-
MRI360	<i>S. aureus</i>	9	β LAC-GLP-AMC-LIN-OZD-EST-RIF-SUL-MAC	0	0	17	0	0	-	-
MRI354	<i>S. aureus</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-OZD-RIF-SUL-MAC	0	0	16	0	0	-	+
MRI361	<i>S. aureus</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-TET-OZD-RIF-SUL	0	0	20	0	2-8	-	-
MRI370	<i>S. aureus</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-EST-RIF-SUL-FLU	0	0	7	0	2-4	-	-
MRI374	<i>S. aureus</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-EST-RIF-SUL-MAC	0	0	7	0	2-8	-	-
MRI382	<i>S. aureus</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-TET-EST-RIF-FLU	0	7	8	0	0-2	-	-
MRI359	<i>S. aureus</i>	7	β LAC-GLP-LIN-TET-OZD-EST-FLU	8	10	21	9	2-4000	-	-
MRI363	<i>S. aureus</i>	7	β LAC-GLP-LIN-OZD-RIF-SUL-MAC	0	0	21	0	0-2	-	-
MRI371	<i>S. aureus</i>	7	β LAC-GLP-AMC-LIN-AMG-RIF-MAC	7	9	25	0	2-8	-	-
MRI197	<i>S. aureus</i>	6	β LAC-GLP-AMC-RIF-MAC	0	8	17	0	0	-	+
MRI211	<i>S. aureus</i>	6	β LAC-GLP-LIN-TET-RIF-FLU	8	15	24	0	0-2	-	-
MRI212	<i>S. aureus</i>	6	β LAC-GLP-LIN-TET-RIF-FLU	7	8	20	9	0	-	-
MRI218	<i>S. aureus</i>	6	β LAC-GLP-LIN-TET-OZD-FLU	9	9	25	10	2-8	-	-
MRI356	<i>S. aureus</i>	6	β LAC-GLP-AMC-LIN-EST-RIF	0	7	20	0	2-8	-	-
MRI372	<i>S. aureus</i>	5	β LAC-GLP-LIN-TET-FLU	7	7	24	9	2-250	-	+
ATCC 43300	<i>S. aureus</i>	5	β LAC-GLP-LIN-AMG-MAC	0	0	11	0	2-6000	+	+
ATCC 29218	<i>S. aureus</i>	1	β LAC	7	11	34	18	0	-	-
MRI241	<i>S. haemolyticus</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-AMG-TET-EST-RIF	27	27	7	7	2-8	+	-

MRI401	<i>S. haemolyticus</i>	7	β LAC-GLP-AMC-AMG-TET-OZD-RIF	18	23	0	0	2-8	+	+
MRI596	<i>S. saprophyticus</i>	5	β LAC-GLP-AMC-LIN-TET	25	32	28	10	0	-	+
MRI506	<i>S. saprophyticus</i>	4	β LAC-AMG-RIF-FLU	18	24	16	0	2-1000	-	-
MRI542	<i>S. saprophyticus</i>	3	β LAC-RIF-MAC	20	24	18	0	2-1000	-	-
MRI604	<i>S. saprophyticus</i>	2	β LAC-RIF	21	28	18	0	2-1000	-	-
MRI493	<i>S. sciuri</i>	3	β LAC-AMG-RIF	16	21	16	0	2-750	+	-
MRI561	<i>S. sciuri</i>	2	β LAC-GLP	0	0	19	0	0	-	-
MRI607	<i>S. sciuri</i>	2	β LAC-AMC	21	30	30	0	2-750	-	-
MRI501	<i>S. epidermidis</i>	7	β LAC-LIN-AMG-CLF-EST-MAC-FLU	15	18	15	0	2-200	-	+
MRI560	<i>S. epidermidis</i>	6	β LAC-LIN-AMG-CLF-EST-FLU	16	19	17	6	2-6000	-	+
MRI293	<i>S. epidermidis</i>	4	β LAC-GLP-LIN-RIF	8	10	21	0	0	-	-
MRI187	<i>S. epidermidis</i>	3	β LAC-LIN-TET	10	11	22	9	0	-	-
MRI232	<i>S. epidermidis</i>	2	β LAC-LIN	9	11	22	8	0	-	-
MRI324	<i>S. epidermidis</i>	2	β LAC-LIN	11	11	22	0	0	-	+
MRI539	<i>S. hominis</i>	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-OZD-EST-RIF-SUL	0	0	16	0	2-600	-	-
MRI540	<i>S. hominis</i>	7	β LAC-AMC-LIN-AMG-OZD-EST-RIF	20	22	18	0	2-1000	-	-
MRI588	<i>S. hominis</i>	7	β LAC-GLP-AMC-LIN-TET-OZD-EST	17	18	22	8	0	-	-
MRI534	<i>S. hominis</i>	5	β LAC-AMC-OZD-RIF-FLU	15	18	14	0	2-1000	+	+
MRI550	<i>S. xylosus</i>	9	β LAC-GLP-AMC-LIN-AMG-TET-CLF-EST-RIF	17	22	0	0	2-8	-	-
MRI465	<i>S. xylosus</i>	4	β LAC-GLP-LIN-RIF	7	9	14	0	2-6	+	-
MRI455	SIG	8	β LAC-GLP-AMC-LIN-EST-RIF-SUL-MAC	8	0	12	0	0	-	+
MRI456	SIG	6	β LAC-GLP-AMC-LIN-EST-RIF	0	8	18	0	2-8	+	+
MRI612	SIG	6	β LAC-GLP-AMC-LIN-TET-EST	22	22	29	8	0	-	+
MRI507	SIG	5	β LAC-GLP-AMC-LIN-RIF	7	8	19	0	0	-	+
MRI294	SIG	3	β LAC-GLP-LIN	8	12	11	0	0	-	-

VI.3.4. Análisis de similitud de los fenotipos multirresistentes en *Staphylococcus* spp., asociado a mastitis bovina.

Con la finalidad de identificar las relaciones fenotípicas de multirresistencia de las diferentes especies de *Staphylococcus*, se utilizaron los datos de los perfiles de resistencia a antimicrobianos de cada aislado y se construyó un cladograma que permitió agrupar a las cepas en función a su similitud fenotípica. En la Figura suplementaria 1 se observa el agrupamiento en siete grupos o clusters en el cladograma (indicados por números romanos). Las cepas sensibles a todos los antibióticos probados se agruparon en el grupo I, en el grupo II se agruparon bacterias resistentes principalmente a VAN y NOV. El grupo III se caracterizó por agrupar cepas resistentes a tres o cuatro antibióticos principalmente PEN, AMP, VAN y LIN. Las cepas resistentes a más de cinco diferentes tipos de antibióticos se observan en los grupos IV, V, VI y VII.

En la Figura 1 se representa exclusivamente los grupos IV y VII, en ellos se observaron cepas de *S. aureus*, SCoN y SIG capaces de resistir entre 9 a 18 diferentes tipos de antibióticos. El análisis del cladograma reveló la agrupación de cepas de *Staphylococcus* con multiresistencia y el fenotipo de resistencia a oxacilina, no obstante, también se observan cepas sensibles a oxacilina. En el grupo IV se agruparon en mayor número de cepas resistentes a oxacilina por la prueba de sensibilidad en disco y que presentaron MIC superiores al punto de corte. En este grupo también se presentaron cepas portadores de los genes *mecA* y *pvl*, como las cepas SIG (MRI456), *S. haemolyticus* (MRI401) y *S. hominis* (MRI534) que comparten grupo y características de resistencia con cepas BORSA (Figura 1).

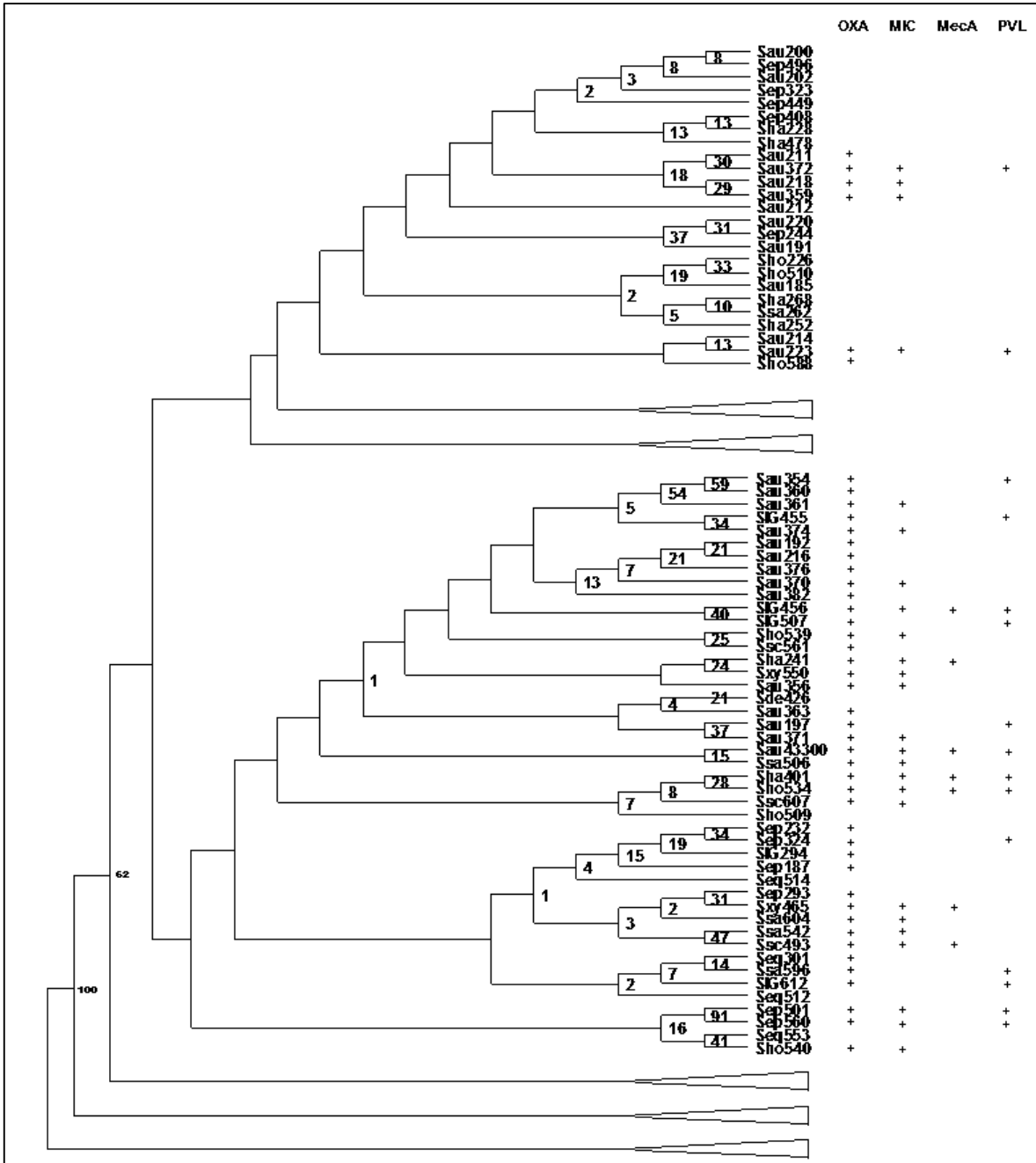


Figura 1. Relación de multiresistencia de especies del género *Staphylococcus* resistentes a Oxacilina. Oxa; Sensidisco de Oxacilina 1 µg, MIC; Concentración mínima inhibitoria, *mecA*; gen de resistencia a meticilina, PVL; Leucotoxina de Phantom Valentine.

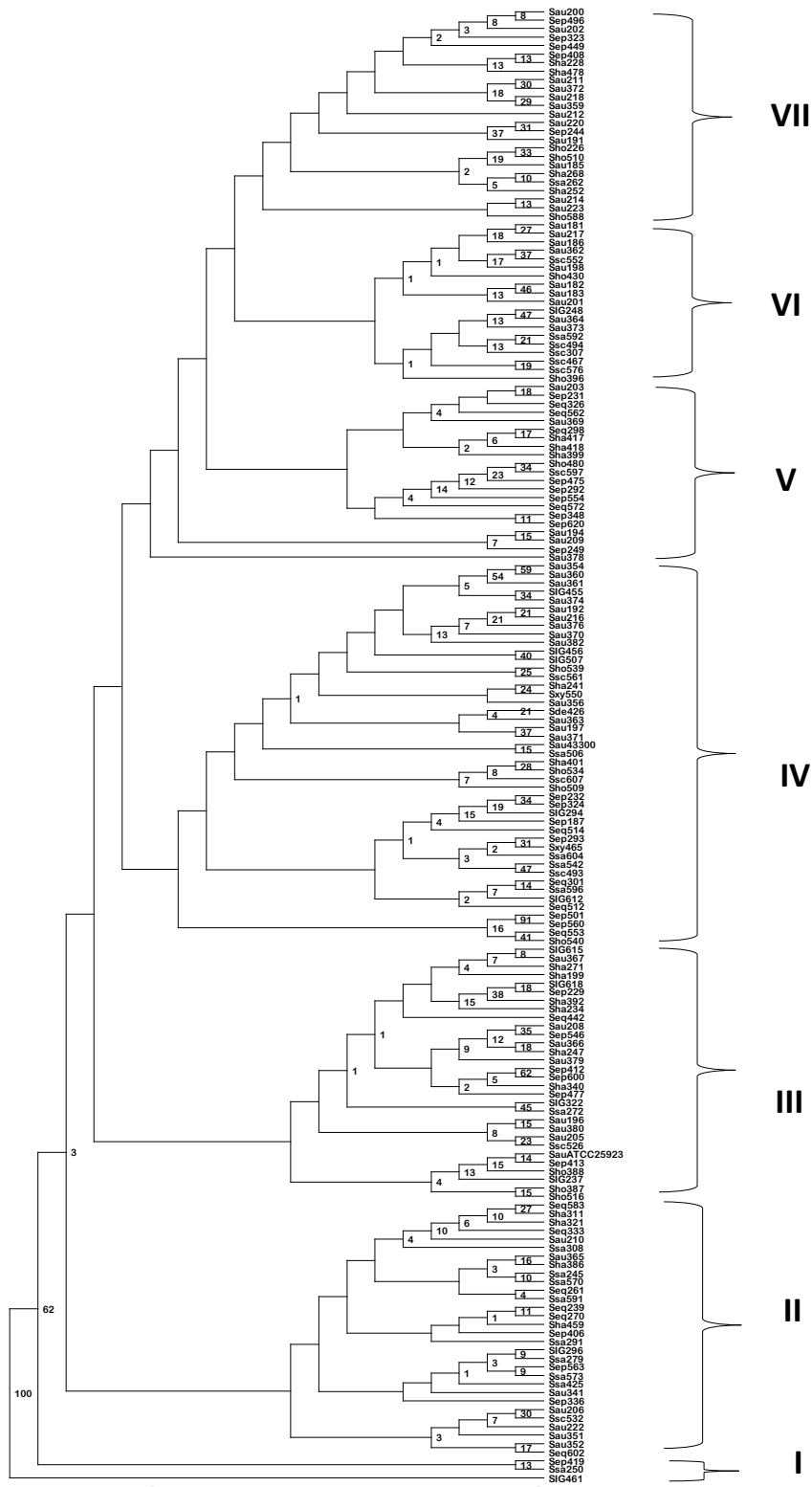


Figura suplementaria 1. Relación de multiresistencia de especies del género *Staphylococcus* resistentes a Oxacilina. Grupo I, sensibles a todos los antibióticos; Grupo II, resistentes principalmente a VAN y NOV; grupo III, cepas resistentes a tres antibióticos principalmente PEN y AMP; grupos IV, V, VI y VII, resistentes a más de cinco diferentes tipos de antibióticos.

VI.4. DISCUSIÓN.

En este reporte *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* y SIG, fueron aisladas frecuentemente en la mastitis subclínica bovina y se encuentran asociados estadísticamente a la mastitis subclínica bovina en granjas familiares. En un reporte previo encontramos que *S. aureus* se presentó con una prevalencia de 16.36 % en el sistema de producción de granjas familiares (Bautista *et al.*, 2013). Otro estudio realizado en la región central de México, *S. aureus* fue aislado con una prevalencia de 30% de los casos de mastitis bovina de vacas Holstein (Miranda *et al.*, 2008). La prevalencia fue mayor comparado con nuestro reporte, sin embargo, ese hecho no es raro, ya que *S. aureus* se ha reportado en todo el mundo con una variación de prevalencia del 5 al 85 %, debido a la persistencia contagiosa de *S. aureus* y al manejo del hato en los diferentes sistemas lecheros (Miranda *et al.*, 2008; Contreras y Rodríguez, 2011; Persson *et al.*, 2011; Piessens *et al.*, 2012).

Anteriormente reportamos que *S. epidermidis* (8.41%), *S. haemolyticus* (7.05%), *S. xylosus* (5.91%), *S. saprophyticus* (5.91%), *S. sciuri* (4.77%), *S. hominis* (3.64%) y SIG (2.50%), fueron prevalentes en el sistema de producción de granjas familiares (Bautista *et al.*, 2013). La literatura indica que la prevalencia de *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* oscila entre un 10 a 40% de los casos de mastitis subclínica bovina (Gillespie *et al.*, 2009; Sampimon *et al.*, 2009; Contreras y Rodríguez, 2011; Persson *et al.*, 2011). *S. hyicus* y *S. xylosus* han sido aisladas en bovinos en un 5-11% (7,8) y *S. hominis*, *S. sciuri* y *S. saprophyticus* entre 1-5% (Gillespie *et al.*, 2009; Piessens *et al.*, 2012). La prevalencia de SIG en mastitis bovina oscila en valores <1 % (O'Neill *et al.*, 2007; Feßler *et al.*, 2010). *S. chromogenes* y *S. simulans* han sido aisladas frecuentemente en un 30-50% (Sampimon *et al.*, 2009; Feßler *et al.*, 2010), no obstante, en nuestro estudio no fueron identificadas. Comparando nuestros resultados con la prevalencia de *Staphylococcus* spp. reportados por los autores, es notable la variación en la prevalencia de *S. aureus*, SCoN y SIG. Interesantemente, se sabe que el tipo de sistema lechero, raza, localización

geográfica y curso de la enfermedad influyen sobre la etiología de la mastitis bovina, lo que explica tal variación etiológica (Pyörälä y Taponen, 2009; Contreras y Rodríguez, 2011; Gillespie *et al.*, 2009; Sampimon *et al.*, 2009; Persson *et al.*, 2011a; Braem *et al.*, 2012; Piessens *et al.*, 2012). Además, el tipo de patología influye sobre la variación de *Staphylococcus* spp., lo anterior fue demostrado con el aislamiento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* solamente en casos de mastitis subclínica bovina, mientras que *S. hyicus* fue aislado solo en casos de mastitis clínica bovina (Persson *et al.*, 2011a, Persson *et al.*, 2011).

En este documento, nosotros reportamos la asociación estadística de *S. aureus* ($P=0.0002$), *S. haemolyticus* ($P=0.0064$), *S. saprophyticus* ($P=0.0213$), *S. sciuri* ($P=0.0167$), *S. epidermidis* ($P=0.0016$), *S. hominis* ($P=0.0459$), *S. xylosus* ($P=0.0155$) y SIG ($P=0.0477$) con la mastitis subclínica bovina. Un estudio previo comparó estadísticamente la etiología microbiana entre vacas sufriendo mastitis con curso crónico y vacas recién infectadas, *S. aureus* ($P<0.01$), *Streptococcus dysgalactiae* ($P<0.02$) y *Streptococcus uberis* ($P<0.004$) fueron más prevalentes y asociadas estadísticamente a vacas sufriendo mastitis con curso crónico (Persson *et al.*, 2011a). De acuerdo con ese estudio, nosotros reportamos asociación estadística de *S. aureus* con la mastitis subclínica bovina. Son pocos los reportes donde se analiza la asociación estadística de las especies bacterianas con la mastitis bovina, a pesar de su utilidad para determinar la probabilidad del agente etiológico para causar mastitis subclínica bovina.

En el presente estudio demostramos altos porcentajes de resistencia a antibióticos beta-lactámicos en *S. aureus*, SCoN y SIG asociadas significativamente a la mastitis subclínica bovina, contrariamente, reportamos bajos porcentajes de resistencia a Oxacilina y Cefoxitina. Esas observaciones fueron similares a la mayoría de los estudios, donde se reporta bajo porcentaje del fenotipo de resistencia a oxacilina en *S. aureus* en el rango de 0.35% al 2 % (Holmes y Zadoks, 2011). Además, evidenciamos que la mayoría de los cepas de *S. aureus* y algunas cepas de SCoN y SIG (Tabla 7), resistieron entre 5 y 9 distintas clases de antibióticos principalmente

β -lactámicos, publicaciones previas han demostrado que un bajo porcentaje de SCoN principalmente *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus* y *S. sciuri* en mastitis subclínica bovina expresan resistencia a más de una clase de antibióticos (Persson *et al.*, 2011a, Huber *et al.*, 2011).

Mediante PCR detectamos la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. xylosus* y SIG multirresistentes. El fenotipo de resistencia a oxacilina y la presencia del gen *mecA* y sus alelos (*mecA_{LGA251}*), son indicadores de cepas resistentes a meticilina (Hiramatsu *et al.*, 2013) y se encontró con mayor frecuencia en SCoN y SIG que en *S. aureus* (De Oliveira *et al.*, 2000; Feßler *et al.*, 2010). El gen *mecA* es un indicador de patógenos de hospital difíciles de tratar con antibióticos y ha sido reportado en bacterias aisladas en mastitis bovina principalmente *S. aureus* (Holmes y Zadoks, 2011) y SCoN (Feßler *et al.*, 2010; Huber *et al.*, 2011; Ünal y Doğu, 2012).

Se sabe que en ocasiones la resistencia de *S. aureus* a β -lactámicos como Oxacilina puede ser originada por hiperproducción de la enzima β -lactamasa (De Oliveira *et al.*, 2000) en ausencia del gen *mecA* y a este tipo de cepas se les denomina BORSA (Hiramatsu *et al.*, 2013). En México, se ha identificado cepas de *S. aureus* (Hamdan *et al.*, 2010), *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* portadores del gen *mecA* en humanos (Garza *et al.*, 2010), sin embargo, hasta el alcance de nuestro conocimiento no existen reportes de cepas BORSA, MRSA, MRSCoN y MRSIG aislados en casos de mastitis bovina en México.

Un reciente estudio demostró cepas de *S. aureus* con un alelo nuevo del gen *mecA* (*mecA_{LGA251}*) aisladas de humanos y bovinos (Ünal y Doğu, 2012; Paterson *et al.*, 2013; Unnerstad *et al.*, 2013). En este trabajo no encontramos evidencia de la presencia del homólogo *mecA*, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que presenten un cassette *SCCmec* nuevo en otro tipo de aislados clínicos o de comunidad (Hiramatsu *et al.*, 2013).

S. intermedius, *S. pseudointermedius* y *S. delphini* representan el grupo denominado SIG (Bannoehr *et al.*, 2007). Nosotros reportamos cepas SIG

multiresistentes que portan el gen *mecA* casos de mastitis subclínica bovina. SIG son comúnmente cepas en infecciones dérmicas, neumonía y septicemia de mascotas (Bannoehr *et al.*, 2009; Nienhoff *et al.*, 2011; Walther *et al.*, 2012). También se ha reportado esporádicamente en bovinos (Braem *et al.*, 2012; Piessens *et al.*, 2012) y en catéter de humanos (Van Hoovels *et al.*, 2006; Chuang *et al.*, 2010). Por otro lado, en la última década se ha reportado una creciente resistencia por parte de SIG hacia varios tipos de antibióticos principalmente a beta-lactámicos (Nienhoff *et al.*, 2011). El reporte de SIG en casos de mastitis bovina, sugiere por un lado la presencia de bacterias emergentes con potencial patógeno y por otro la presencia de bacterias con elementos de resistencia susceptibles de movilidad genética, que podrían estar influenciando en la competencia del nicho e incremento el poder virulento de otro tipo de bacterias. Lo anterior se fundamenta en los estudios de secuenciación de *S. pseudointermedius* ED98 de canino, donde demostraron la presencia de numerosos elementos genéticos móviles, incluyendo elementos de inserción y transposones mediando la resistencia a antibióticos, además de la presencia de genes que codifican un número de toxinas como superantígenos Se-int y el biocomponente de leucotoxina Panton-Valentine Luk-I (Ben Zakour *et al.*, 2011).

En este trabajo, hemos demostrado la presencia del gen *pvl* que codifica para la leucotoxina formadora de poros Panton-Valentine, en cepas de BORSA, MRSCoN y MRSIG asociados de manera estadística a la mastitis subclínica bovina. Panton-Valentine (*pvl*) por lo general se relaciona con cepas virulentas de comunidad y hospitales, específicamente se ha relacionado con cepas MRSA que se diseminan rápidamente en la comunidad (Lindsay y Holden, 2004), provocando infecciones de piel (Dufour *et al.*, 2002; Kreienbuehl *et al.*, 2011) y neumonía hemolítica en niños (Gillet *et al.*, 2002). En hospitales se asocia a respuesta inflamatoria en pulmón (Zivkovic *et al.*, 2011).

Se ha investigado la presencia del locus de *pvl* en cepas de *S. aureus* aislado de vacas (Zecconi *et al.*, 2006; Aires de Sousa *et al.*, 2007) y de humanos (Kreienbuehl *et al.*, 2011), contrariamente, son pocos los reportes de *pvl* en SCoN aislados en

mastitis subclínica bovina, no obstante, se ha reportado en *S. haemolyticus* aislados en vacas (Ünal y Doğu, 2012). Se sabe que el gen *pvl* es acarreado por profagos como por ejemplo ØSa2mw en *S. aureus* (Zhang *et al.*, 2008), lo que explica la movilidad genética y la presencia de cepas que podrían servir como reservorio del locus *pvl*. Estudios preliminares en nuestro laboratorio sugieren la presencia de cepas MSSA-ST8 (Valdez *et al.*, 2014). El genotipo ST8 se ha asociado a infecciones de comunidad. La presencia de *pvl* en cepas BORSA, MRSCoN y MRSIG que coexisten con cepas de *S. aureus* con genotipos como el ST8, constituyen un factor de riesgo, ya que las cepas ST8 pueden recibir tanto los genes *pvl* como cassettes *SCCmec* de las otras especies de *Staphylococcus* que los contienen en la comunidad, convirtiéndose en nuevas cepas con potencial patogénico para la comunidad (Diep y Otto, 2008). Además, es importante considerar que en los sistemas de producción de leche basados en la ganadería familiar o de traspatio, las condiciones higiénicas son mínimas y el contacto con el ordeñador por el ordeño manual, pueden incrementar el riesgo de transmisión de estas potencialmente nuevas cepas. Los resultados evidenciaron la agrupación de las cepas en función a la similitud de resistencia de *S. aureus*, SCoN y SIG, las cuales están asociadas estadísticamente a la mastitis subclínica bovina, además, alguna de ellas con fenotipo resistente a oxacilina y portando el gen *mecA* y *pvl*. Existe suficiente evidencia de la coexistencia y persistencia del nicho de *S. aureus*, SCoN y SIG en casos de mastitis bovina (Pyörälä y Taponen, 2009; Braem *et al.*, 2012; Piessens *et al.*, 2012), lo que sugiere que genotipos específicos se diseminan dentro de la granja y persisten en la teta bovina al igual que *S. aureus*. La hipótesis anterior fue demostrada con la alta heterogeneidad genética de *S. haemolyticus*, que sugiere gran variedad de genotipos y el ambiente como fuente potencial de infección (Piessens *et al.*, 2012). En contraste, *S. epidermidis* representa poca heterogeneidad genética y alta clonalidad (Piessens *et al.*, 2012). La coexistencia desde el punto de vista ecológico significa competir por el sustrato u hospedero evolucionando (Walther *et al.*, 2012) e interactuando genéticamente (Lindsay y Holden, 2004), se ha demostrado que rara vez se encuentra una sola cepa en una infección y la comunicación interespecies por señales *quorum sensing* entre

Staphylococcus es posible (Boyen *et al.*, 2009; Caetano *et al.*, 2010). La capacidad de internalización y evasión del mecanismo de fagocitosis de *S. aureus* representa una ventaja ante otras bacterias no competentes, ya que se sabe sobre la capacidad proinflamatoria de *S. aureus* y la activación de quimiocinas que evocan la afluencia de leucocitos y células fagocíticas (Fraunholz *et al.*, 2012), lo que podría sugerir un escenario de competencia del nicho. Por otro lado, se sabe de la transferencia horizontal de genes entre *Staphylococcus*, principalmente genes de virulencia y resistencia a los antibióticos que se lleva a cabo por plásmidos y fagos en *S. aureus* (Lindsay y Holden, 2004), específicamente, se ha reportado la transferencia horizontal de *mecA* de *S. epidermidis* (Wielders *et al.*, 2001) y *S. haemolyticus* (Berglund y Soderquist, 2008), *S. sciuri* (Couto *et al.*, 1996) a cepas de *S. aureus*, consistiendo en un mecanismo positivo de evolución. Lo interesante de nuestro hallazgo originado por la agrupación en función a la similitud de resistencia, es observar cepas SCoN y SIG con fenotipo resistente a oxacilina, OxaMIC, portadores el gen *mecA* y *pvl*, compartiendo características con cepas BORSA, lo anterior advierten sobre el riesgo de posibles interacciones genéticas entre bacterias, una alta probabilidad de transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles entre especies de *Staphylococcus* causantes de mastitis subclínica bovina, que podrían favorecer la evolución de nuevas cepas MRSA, MRSCoN y MRSIG difíciles de tratar para bovinos.

VI.5. CONCLUSIONES.

En conclusión, reportamos la asociación estadísticamente significativa de *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. xylosus* y SIG con la mastitis subclínica bovina. Además, hacemos el primer reporte en México de algunas cepas de BORSA, MRSCoN y MRSIG aisladas en casos de mastitis subclínica bovina, que comparten características de multirresistencia hacia los antibióticos y portan el gen *pvl*. Los datos reportados en este trabajo, sugieren la presencia de un complejo de *Staphylococcus* en casos de mastitis subclínica bovina que sirven de reservorio de genes de virulencia.

VII. Polimorfismos de restricción en genes de adhesinas de aislados de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis subclínica bovina

RESUMEN.

En el presente trabajo se analizó el polimorfismo de restricción y se estableció la asociación estadística entre los diferentes perfiles alélicos y la mastitis subclínica bovina, así como el índice de discriminación de PCR-RFLP de las adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB* de *S. aureus*. Se usaron aislados de *S. aureus* de una colección obtenida en casos de mastitis subclínica bovina de sistemas lecheros de traspatio. Se determinaron los alotipos de las adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB*, y del gen *coa* por el método PCR-RFLP. El análisis de restricción reveló que algunos alotipos se asociaron estadísticamente a mastitis subclínica bovina y usando PCR-RFLP con la combinación de cuatro adhesinas se obtuvo el máximo valor del índice de discriminación. La combinación de las adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* favorecieron la caracterización de *S. aureus*, lo que representa una alternativa como un método de caracterización molecular rápida, económica y versátil.

VII.1. INTRODUCCION.

Staphylococcus aureus es un patógeno de humanos y animales debido a su arsenal de toxinas, adhesinas, genes reguladores, de resistencia a antibióticos y su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Miller y Diep, 2008). Las moléculas de la superficie celular microbiana conocidas como adhesinas son un factor clave en la infección, ya que son el primer punto de contacto en la interacción bacteria-célula blanco (Zecconi y Scali, 2013). Las adhesinas se unen a proteínas del plasma y de la matriz extracelular de células como: fibrinógeno, fibrina, vitronectina, trombospondina, fibronectina y colágeno, que permite a la bacteria adherirse a la superficie de las células blanco para invadir fagocitos no profesionales como osteoblastos, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales y endoteliales (Garzoni and Kelley, 2008).

En función a un análisis bioinformático previo, utilizando la información que se deriva de la secuenciación del genoma de diferentes aislamientos de *S. aureus* obtenidas

en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information; NCBI), fue posible seleccionar un grupo de genes potencialmente involucrados en la virulencia del patógeno y en la especificidad del hospedero. Se seleccionaron para la estrategia metodológica las proteínas de unión a fibronéctina *fnbA* y *fnbB*, así como la proteína aglutinante *clfB* y *clfA*. Estas adhesinas resultaron con la mayor tasa de sustitución no sinónima/sinónima (3.14, 4.16, 2.61 y 3.20 respectivamente) y con un alto índice de diversidad nucleotídica (0.117, 0.102, 0.69 y 0.048 respectivamente). Estos valores fueron determinantes para su selección, ya que se sabe que los genes con altas tasas de sustitución de aminoácidos (dN/dS) y diversidad nucleotídica se relacionan con un alto grado de heterogeneidad de aminoácidos, que podrían en su caso modificar la funcionalidad de la proteína (Lamers *et al.*, 2011). Las adhesinas se encuentran localizadas y casi siempre presentes en el genoma bacteriano y debido a eso son ideales para ser considerados en un método de funcionalidad y caracterización molecular (Fraunholz y Sinha, 2012).

Las proteínas de unión a fibronéctina (FnbA y FnbB) favorecen la unión a fibrinógeno, elastina y fibronéctina (Fn), y la invasión a células de mamíferos, incluyendo células epiteliales, endoteliales y células fibroblásticas. La adhesión se produce por la unión entre las proteínas FnBPs y el receptor de fibronéctina ligando de la integrina $(\alpha 5)\beta 1$ (Grundmeier *et al.*, 2004). Ambas proteínas FnBP's promueven la adherencia e inmovilización a fibrinógeno y elastina vía interacción con los residuos específicos del subdominio N2, dentro del dominio A (Keane *et al.*, 2007; O'Neill *et al.*, 2008). Además, Meenan *et al.*, 2007, demostró que las FnBP's contienen motivos que se unen a fibronéctina en sus dominios 2-5 con mayor afinidad ($K_D=2-2.5 \mu M$). Por otro lado, ClfA es el principal factor de virulencia responsable de la aglutinación de *S. aureus* en plasma sanguíneo, en particular, ClfA es conocido por participar en el proceso de infección, facilitando la unión de la bacteria a través de inmovilizar o solubilizar fibrinógeno (Evagrio *et al.*, 2006; Ganesh *et al.*, 2008). En el dominio de unión a fibrinógeno de las proteínas ClfA y ClfB, se han reportado los motivos de adhesión dependiente del ion metal (MIDAS) y EF, ambos cruciales para la estabilidad de la unión de la proteína (Eidhin *et al.*,

1998). Tomando en cuenta que las adhesinas están casi siempre presente en cepas de *S. aureus* (Fraunholz y Sinha, 2012) y que están sujetos a cambios puntuales en la estructura de los genes (McCarthy y Lindsay, 2010), se hace interesante caracterizar los alelos de adhesinas en poblaciones de *S. aureus*, lo que podría generar información importante ante la invasividad, competencia del nicho y respuesta inmunológica, pasos importantes para su internalización y/o patología de la bacteria (Henderson *et al.*, 2010). Además, la agrupación de alelos de adhesinas es una información útil para ser utilizados como herramienta de tipificación de *S. aureus*.

El uso de adhesinas para tipificar *S. aureus* se ha reportado anteriormente, en un estudio previo se utilizó huella genómica con los genes *fnbA*, *fnbB* para la diferenciación epidemiológica de *S. aureus* (Smeltzer *et al.*, 1997). Koreen *et al.*, 2005, realizaron la combinación de los datos de *clfB* typing y *spa* typing, incrementando el índice de discriminación (99.5%) para la diferenciación molecular de *S. aureus*. Recientemente, se utilizó la región de repetidos de los genes *fnb* y *clf* de *S. aureus* para caracterizar la relación genética entre aislados de portadores nasales y clínicos, favoreciendo la subtipificación de *S. aureus* en combinación con MLST (Lamers *et al.*, 2011).

Existen otros métodos fenotípicos y genotípicos empleados para la caracterización epidemiológica molecular de *S. aureus*. En todos ellos se buscan características importantes como caracterizabilidad, índice de discriminación, reproducibilidad, fácil uso e interpretación y bajo costo (Tenover *et al.*, 1994). Los bacteriófagos se han empleado como marcadores fenotípicos para la caracterización de *S. aureus* (Widemauwe *et al.*, 2004), la alta especificidad y variabilidad de los bacteriófagos los han hecho métodos limitados. Electroforesis de gel de campos pulsados (PFGE) y Multilocus sequence typing (MLST) son consideradas ideales para estudios epidemiológicos de *S. aureus* y otras bacterias (Maiden *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2007), sin embargo, por su alto costo y entrenamiento especializado del personal, no es recomendable para estudios epidemiológicos locales y de gran escala (Struelens *et al.*, 2009). *spa*-typing es una técnica con alto valor informativo desde

el punto de vista de la epidemiología global. *spa*-typing ha demostrado ser un método con eficiente discriminación de *S. aureus* (Aires-de-Sousa *et al.*, 2006), sin embargo, en ocasiones la variabilidad de las firmas y secuencia de repetidos no la hacen útil para el total de los aislados (Faria *et al.*, 2008). Según algunos autores, el análisis de múltiple locus de número variable repetidos en tándem (MLVA, por sus siglas en inglés, multiple-locus variable number-repeat analysis) es un método de genotipificación de *S. aureus* de relativo bajo costo y de procedimiento rápido (Malachowa *et al.*, 2005; Schouls *et al.*, 2009), con índice de discriminación comparable con PFGE, MLST y *spa* typing, sin embargo, se requiere de una batería de primers y un esquema específico para cada locus, lo que incrementa su costo (Ikawaty *et al.*, 2008).

El análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) es un método que se caracteriza por el reconocimiento de secuencias específicas de ADN por enzimas de restricción, las cuales generan patrones de restricción que se modifican por la presencia de mutaciones en los sitios de restricción o la aparición de nuevos sitios. PCR-RFLP de *clfB* fue utilizado para la caracterización de *S. aureus* aislados de ovejas (Vaoutor *et al.*, 2005). PCR-RFLP usando el gen de coagulasa (*coa*) de *S. aureus* se ha empleado para la caracterización de *S. aureus* de origen bovino (Karahan y Cetinkaya, 2007; Hata *et al.*, 2010) o para la discriminación de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Ishino *et al.*, 2007), Si bien es cierto RFLP es un método de bajo índice de discriminación, es relativamente económico y rápido para genotipificar aislados de *S. aureus* (Vaoutor *et al.*, 2005; Awadalla *et al.*, 2010). Otros autores han propuesto alternativas de PCR-RFLP para la caracterización de *S. aureus*. Blaiotta *et al.*, 2010 utilizó el gen *kat* (catalasa) como marcador para inferir relación filogenética de *S. aureus*, en el mismo sentido se han reportado PCR-RFLP de la región intergenica del gen 16S rRNA y 23S-rNA (Blaiotta *et al.*, 2003), gen *gap* que codifica para la proteína de unión a transferrina (Yugueros *et al.*, 2001), el gen *aroA* que codifica a la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (Yugueros *et al.*, 1999), *dnaJ* o proteína Hsp40 (Hauschild y Stepanovic, 2008). En otro estudio, se empleó PCR-RFLP del

gen *mecA*-HVR y permitió discriminar aislados en hospitales y comunidades (Awadalla *et al.*, 2010).

En este estudio se determinó el índice de discriminación de PCR-RFLP de adhesinas de *S. aureus* y se relacionaron los patrones de restricción obtenidos con la mastitis subclínica bovina. PCR-RFLP usando adhesinas, podría considerarse como un método para la genotipificación de *S. aureus*, discriminativo, reproducible, económico y rápido para laboratorios de escasos recursos. Además, los alelos identificados por PCR-RFLP de adhesinas, pueden ser candidatos ideales para estudios posteriores de patogénesis molecular y para la formulación de estrategias biotecnológicas para el control de enfermedades causadas por *S. aureus*.

VII.2. MATERIALES Y METODOS.

VII.2.1. Aislamiento e identificación de *S. aureus*.

Los aislados de *S. aureus* usados en este trabajo fueron obtenidos de casos de mastitis subclínica bovina de sistemas lecheros de traspatio. El aislamiento se realizó en medios diferenciales y/o selectivos y la identificación bioquímica fue determinada con la prueba de actividad de coagulasa, β -hemolisis y secuenciación parcial del ARNr 16S. Las secuencias de la región variable 3 del ARNr 16S (*rrs*) se encuentran depositadas en la base de datos del GenBank con números de acceso JQ511370-JQ511809 (Bautista *et al.*, 2013).

VII.2.2. Extracción de DNA genómico.

El ADN genómico de los aislados de *S. aureus* fue obtenido incubando una suspensión bacteriana con 100 μ l de buffer TEN (30 mM TRIS-HCl pH 8; 5 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl) y 32 μ L de la enzima lisostafina (50 mg/L), 10 lisozima (1 g/L) y 20 μ l de Proteinasa K (20 mg/mL 10 mM Tris-HCl pH 8). El producto obtenido fue purificado por centrifugación primeramente con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), seguido de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) saturado con Tris-HCl 0.1 M pH 8 y por último con Isopropanol. El

producto de ADN obtenido fue suspendido en buffer de Tris-HCl 1M (pH8) y EDTA 0.5 M para su conservación (Protocolo modificado; Fitzgerald *et al.*, 1997).

VII.2.3. Análisis bioinformático de genes de adhesinas de *S. aureus*.

Los genes seleccionados para la búsqueda de polimorfismos se indican en la Tabla 9. Las secuencias de adhesinas de *S. aureus* usadas en este análisis, fueron obtenidas en el sitio de Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; se usaron los datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para el alineamiento de nucleótidos se utilizó el programa MEGA v6 (Tamura *et al.*, 2013) y para el análisis de polimorfismo se utilizó el programa DnaSP v5 (Librado y Rosas, 2009; Lamers *et al.*, 2011).

VII.2.4. Construcción filogenética de los datos

Los fragmentos de PCR amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2.5 %) a 100 V por 2 horas. Los geles obtenidos fueron teñidos con SyberGreen® (Invitrogen) y las bandas fueron visualizados en un transiluminador (UV). Se utilizó marcador de peso molecular lambda de 50 pb, 100 pb y 1 kb (Invitrogen, USA). Los geles de agarosa fueron visualizados con el software GelAnalyzer 2010a (Lazar, 2010), para la calibración precisa y determinación de la longitud de las bandas de restricción.

A partir de los datos de tamaño molecular de las bandas de cada muestra, se construyó una base de datos binarios (1=presencia, 0=ausencia) en hoja de Excel. Los datos binarios fueron usados para la elaboración de una matriz de distancia/similitud (Nei and Li/Dice, Bootstrapping 1000), para ello se utilizó el software FreeTree versión 0.9.1. 50 (Pavlíček *et al.*, 1999). Por último, se construyó un cladograma de similitud usando el programa TreeViewX versión 0.5.0, con la finalidad de determinar grupos o alotipos en cada loci utilizado (Page, 1996).

VII.2.5. PCR-RFLP de adhesinas.

Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes de adhesinas se muestran en la Tabla 9 y fueron diseñados a partir de las regiones conservadas de los extremos 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos para cada gen, con la finalidad de garantizar la correcta complementación de los oligonucleótidos.

Para todos los protocolos de amplificación, se preparó una mezcla con el ADN molde, 75 pmol de cada primer, 50 mM deoxinucleosido-trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 3 mM de Cloruro de magnesio. La mezcla de PCR fue incubada a 95°C por 5 minutos, seguido de 32 ciclos a 95°C por 30 segundos: La temperatura de alineamiento para cada protocolo de adhesinas se muestra en la Tabla 9. Se incubó por 2 minutos, la temperatura de extensión fue de 72°C durante 4 minutos en todos los casos. Se completó la reacción con una incubación final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR amplificados de *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* fueron tratados con la enzima de restricción *TaqI* (New England Biolabs) según las especificaciones del fabricante.

Por otro lado, la amplificación del gen *coa* se llevó a cabo como la indica Hookey *et al.*, 1998, los productos amplificados del gen *coa*, se trataron con la enzima de restricción *AluI* (New England Biolabs).

Tabla 9. Primers usados en la técnica de PCR para amplificar adhesinas de *S. aureus*.

Nombre del primer	Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño (Pb)	Tm (°C)	Referencia
ClfA1F	<i>clfA</i>	AGTGAAAATAGTGTTACGCAATCT	(1800-2500)	55.4	Este estudio
ClfA3R		AGGCGRNACTACATTATTG			
ClfB1F	<i>clfB</i>	TAAATACAACGGCTAATGA	(1800-2500)	52.5	Este estudio
ClfB3R		TTTATGATCTTGCTTGCGTTTTCT			
FnbA1F	<i>fnbA</i>	TGGGAGCAGCATCAGTATTC	(1800-2400)	47.7	Este estudio
FnbA3R		GCTGAATAATCCGCCGAAC			
FnbB1F	<i>fnbB</i>	AGATGAAACACAATCATAACAGCG	(1800-2400)	48.5	Este estudio
FnbB3R		TAGGTTCTTCTTTTRGCAGGTGG			
CoaF	<i>coa</i>	ATAGAGATGCTGGTACAGG	(250-750)	57	Hookey <i>et al.</i> , 1998
CoaR		GCTTCCGATTGTTTCGATGC			

VII.2.6. Análisis Estadístico y Evaluación del índice de discriminación.

En una hoja de Excel, se anotaron las 72 cepas de *S. aureus*. En función al alotipo o grupo alélico perteneciente, se elaboró una base de datos dicotómicos (1=presencia o pertenencia al alelo, 0=ausencia). Los datos fueron evaluados con la prueba de chi cuadrada (χ^2) usando el método de corrección de Fisher exacto para muestras pequeñas ($N \leq 20$) y corrección de Yates para muestras grandes, ambos métodos de corrección se usaron solo en los caso de celdas con muestras menores de 5 en una Tabla de contingencia de 2x2. Con la finalidad de medir la probabilidad o asociación estadística de un evento que ocurre en función de diversos factores, las variables con valores de $P < 0.05$ fueron analizados bajo un modelo de regresión logística. Los alotipos con un valor de $P < 0.05$ fueron considerados como alelos asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina. Se utilizó el paquete estadístico del software Egret v. 2.0.3.1 (Cytel). El intervalo de confianza fue del 95 %. Se determinó el poder de discriminación (ID) de los métodos de PCR-RFLP de adhesinas calculando el índice de diversidad de Simpson's con un intervalo de confianza del 95%. Para explorar la correlación entre los métodos de PCR-RFLP de adhesinas, se calculó en coeficiente ajustado de Rand's y Wallace's. El ID y los coeficientes de Rand's y Wallace's fueron calculados usando el programa Ridom EpiCompare v1.0(Ridom GmbH, Wurzburg, Germany).

VII.3. RESULTADOS

VII.3.1. Análisis bioinformático de genes de adhesinas de *S. aureus*.

En el Tabla 10, se presenta un análisis de comparación de secuencias de adhesinas de *S. aureus*, los genes *fnbA* y *fnbB* presentaron la mayor diversidad de nucleótido (π) con 0.117 y 0.102 respectivamente, seguido de *sdrD* (0.072), *clfA* (0.069), *sdrC* (0.065), *efb* (0.051), *clfB* (0.048), *sbi* (0.043), *ebh* (0.041), *sdrE* (0.026), *IsdA* (0.026), *ebps* (0.020), *IsdB* (0.020) y *IsdC* (0.016). También se observan los valores del cociente de sustitución no sinónima/sustitución sinónima (dN/dS), el gen *Ebps* resulto con el mayor valor de (dN/dS) igual a 4.47 (85/19) seguido de *fnbB*, *sdrC*, *isdA*, *clfB*, *fnbA*, *ebh*, *clfA*, *isdB*, *efb* y *isdC* con 4.16 (545/131), 3.60 (386/107), 3.41 (424/124), 3.20 (237/74), 3.14 (349/111), 3.08 (2810/911), 2.61 (311/119), 2.38 (86/36), 1.28 (45/35) y 0.85 (17/20) respectivamente.

Tabla 10. Análisis bioinformático de genes de adhesinas de *S. aureus*.

Nombre de la adhesina	Gen	No. de Secuencias	No. de sitios	No. de sitios polimórficos	Diversidad de nucleótido (π)	Sustitución no sinónima (dN)	Sustitución sinónima (dS)	dN/dS
Proteína de unión a Fibronéctina A	<i>fnbA</i>	13	3284	761	0.117	349	111	3.14
Proteína de unión a Fibronéctina B	<i>fnbB</i>	14	3028	815	0.102	545	131	4.16
Proteína de Aglutinacion A	<i>clfA</i>	16	3223	438	0.069	311	119	2.61
Proteína de Aglutinacion B	<i>clfB</i>	21	3122	320	0.048	237	74	3.20
Proteína de unión rica en serina y aspartato C	<i>SdrC</i>	17	3451	542	0.065	386	107	3.60
Proteína de unión rica en serina y aspartato D	<i>SdrD</i>	18	4616	940	0.072	556	300	1.85
Proteína de unión rica en serina y aspartato E	<i>SdrE</i>	16	3513	256	0.026	51	205	0.24
Glicoproteína Sbi	<i>sbi</i>	29	1367	267	0.043	112	112	1
Proteína de unión a fibrinógeno	<i>efb</i>	10	502	78	0.051	45	35	1.28
Proteína de unión a elastina	<i>ebpS</i>	20	1470	101	0.020	85	19	4.47
Proteína de unión a matriz extracelular	<i>ebh</i>	10	29325	3608	0.041	2810	911	3.08
Proteína de superficie A	<i>IsdA</i>	17	1065	643	0.026	424	124	3.41
Proteína de superficie B	<i>IsdB</i>	14	1926	121	0.020	86	36	2.38
Proteína de superficie C	<i>IsdC</i>	17	710	37	0.016	17	20	0.85

VII.3.2. Asociación estadística de los Patrones de restricción por PCR RFLP de los genes *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* de *S. aureus*.

En la Tabla 11, se muestra la asociación estadística y la razón de riesgo de los patrones de restricción obtenidos con la enzima *TaqI*. El alotipo A de *fnbA*, alotipo G de *fnbB*, alotipo A de *clfA*, alotipo A de *clfB*, alotipo U de la combinación de *clfA* + *clfB*, y el alotipo X de la combinación de adhesinas y alotipo I del gen *coa*, se asociaron estadísticamente a mastitis subclínica bovina (Tabla 11, Figuras 1, 2 y 3).

Por otro lado, en los alotipos con asociación estadística significativa con la mastitis subclínica bovina, se agruparon las cepas MRI181, MRI184, MRI185, MRI186, MRI202, MRI217, MRI223, MRI352, MRI353, MRI354, MRI355, MRI357, MRI358, MRI361, MRI363, MRI364, MRI370, MRI373, MRI379 y MRI382 en todos los casos, lo que evidencio una agrupación y caracterización consistente de cepas de *S. aureus*, independientemente de la adhesina utilizada (Figuras 2, 3 y 4).

Tabla 11. Identificación de Alotipos asociados a mastitis subclínica bovina (Regresión logística, $P < 0.05$) obtenidos usando diversos métodos de RFLP de adhesinas de *S. aureus*.

Método de RFLP de Adhesina/Alotipo asociado estadísticamente a mastitis bovina	valor de P	Odss Ratio
<i>fnbA</i> / A	0.04	3.95
<i>fnbB</i> / G	0.01	6.6
<i>clfA</i> / A	0.01	12.5
<i>clfB</i> / A	0.01	12.5
Combinación de <i>clfA+clfB/U</i>	0.02	10.60
Combinación de adhesinas / X	0.02	11.45
<i>coa</i> / I	0.03	6.61

VII.3.3. Índice de discriminación de PCR-RFLP de genes *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* de *S. aureus*.

Todos los aislados de *S. aureus* produjeron amplicones de PCR de las adhesinas, los productos de PCR de las adhesinas fueron digeridos con *Taq I* y los patrones de restricción obtenidos se muestran en la Figura 12. Se observaron 15 patrones de restricción obtenidos con la digestión del gen *fnbA* (Panel A) y *fnbB* (Panel B). En el panel C se observaron 18 patrones de restricción obtenidos con la digestión del gen *clfA* y 16 patrones con la digestión del gen *clfB* (Panel D). En la figura 2, se observaron 34 patrones de digestión de PCR-RFLP obtenidos cuando se utilizó la combinación de datos de digestión de *clfA*, *clfB*, *fnbA* y *fnbB* de *S. aureus*.

En la Tabla 12 se muestran los valores del índice de diversidad de Simpson (ID) y de correlación por el coeficiente ajustado de Rand's y Wallace para los métodos de PCR-RFLP de adhesinas usados para caracterizar *S. aureus* aislados de mastitis bovina. Cuando se compararon los valores del índice de discriminación de PCR-RFLP de las adhesinas usadas de manera individual, *clfA* fue la adhesina que favoreció el mayor índice de discriminación (0.862) comparado con *clfB*, *fnbA* y *fnbB* (0.849, 0.766 y 0.721 respectivamente). Sin embargo, cuando se utilizaron los valores de restricción de las adhesinas *clfA* y *clfB* de manera combinada se incrementó el índice de discriminación (0.893). Al combinar los datos de restricción de las cuatro adhesinas se obtuvo el máximo valor de índice de discriminación (0.912).

El índice de discriminación de PCR-RFLP del gen *coa* también se muestra en la Tabla 12 y fue bajo (0.744) comparado con los demás métodos. Sin embargo las cepas MRI222 y MRI194 se lograron discriminar usando PCR-RFLP del gen *coa* (Figura 3) a diferencia del uso de adhesinas de manera individual y combinada.

El método de PCR-RFLP usando la suma de *clfA* y *clfB* mostro el mayor coeficiente ajustado de Rand's (0.832) y Wallace's (0.774) comparado con el método de PCR-RFLP usando la suma de adhesinas. PCR-RFLP del gen *coa* fue el método con el

menor coeficiente ajustado de Rand's (0.735) y Wallace's (0.156) comparado con el método de PCR-RFLP usando la suma de adhesinas.

Tabla 12. Índice de diversidad de Simpson v valores de concordancia entre métodos de RFLP de adhesinas usados para caracterizar 72 cepas de *S. aureus* aislados de mastitis bovina

Adhesina	Número de Patrones de digestión PCR-RFLP	Índice de discriminación (ID) (95% IC)	Concordancia entre métodos	
			Ajuste de Rand's	Coeficiente de Wallace's
<i>coa</i>	10	0.744 (0.682-0.806)	0.115	0.156
<i>fnbA</i>	15	0.766 (0.697-0.836)	0.483	0.379
<i>fnbB</i>	15	0.721 (0.648-0.794)	0.809	0.401
<i>clfA</i>	18	0.862 (0.804-0.919)	0.722	0.616
<i>clfB</i>	16	0.849 (0.795-0.904)	0.7	0.582
<i>clfA + clfB</i>	27	0.893 (0.834-0.952)	0.832	0.774
Suma de Adhesinas <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i>	34	0.912 (0.859-0.964)	-----	-----

*Comparado con el método de Suma de Adhesinas

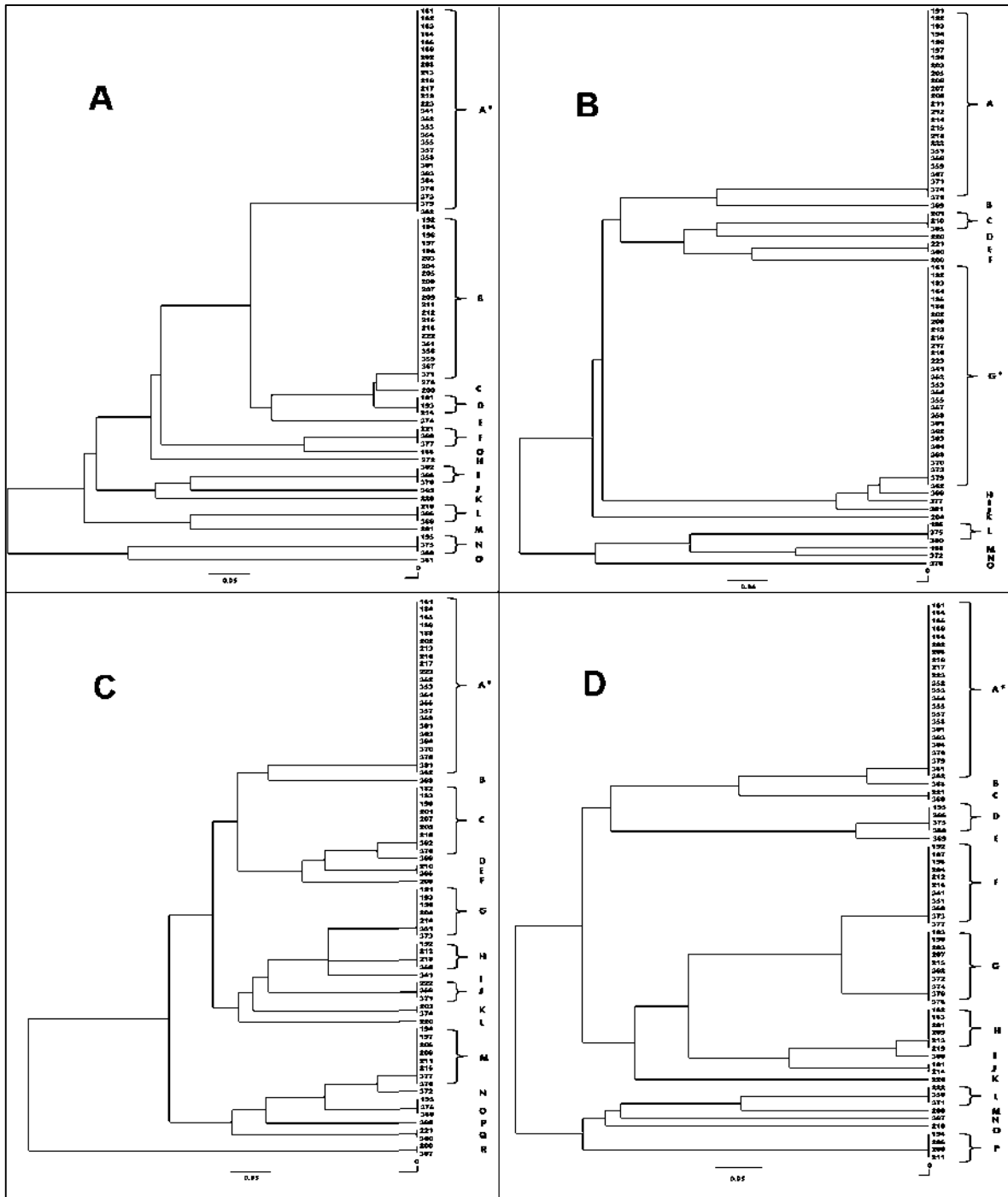


Figura 2. Identificación de alotipos de adhesinas de *S. aureus* por RFLP. Panel A; FnbA, panel B; FnbB, panel C; ClfA, panel D; ClfB. Alotipo A de FnbA, alotipo G de FnbB, alotipo A de ClfA y alotipo A de ClfB, resultaron asociados estadísticamente a mastitis subclínica bovina.

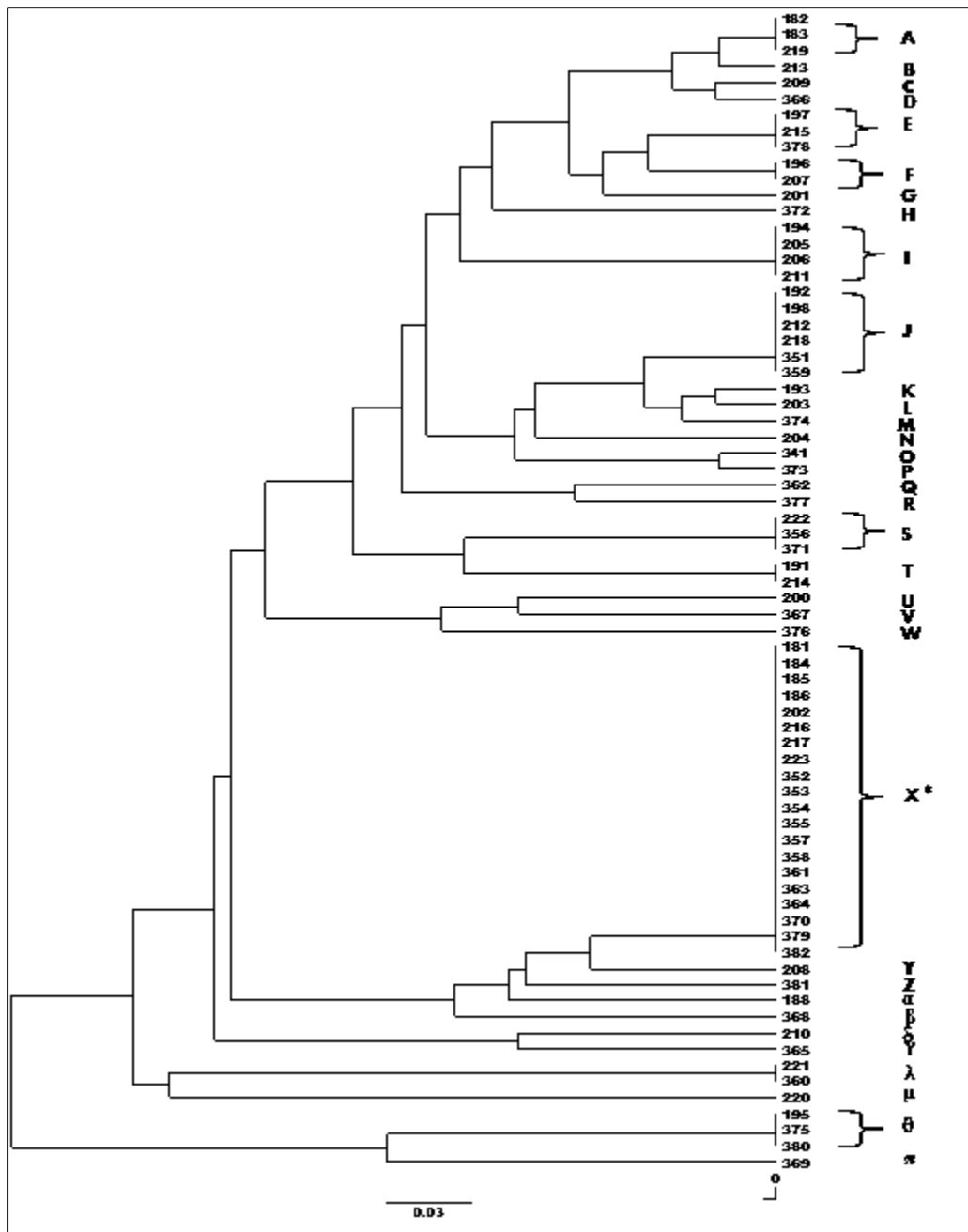


Figura 3. Identificación de alotipos de adhesinas de *S. aureus* por RFLP usando la combinación de genes *fnbA*, *fnbB*, *clfA*, *clfB*. Se observa el Alotipo X, el cual está asociado estadísticamente a mastitis subclínica bovina.

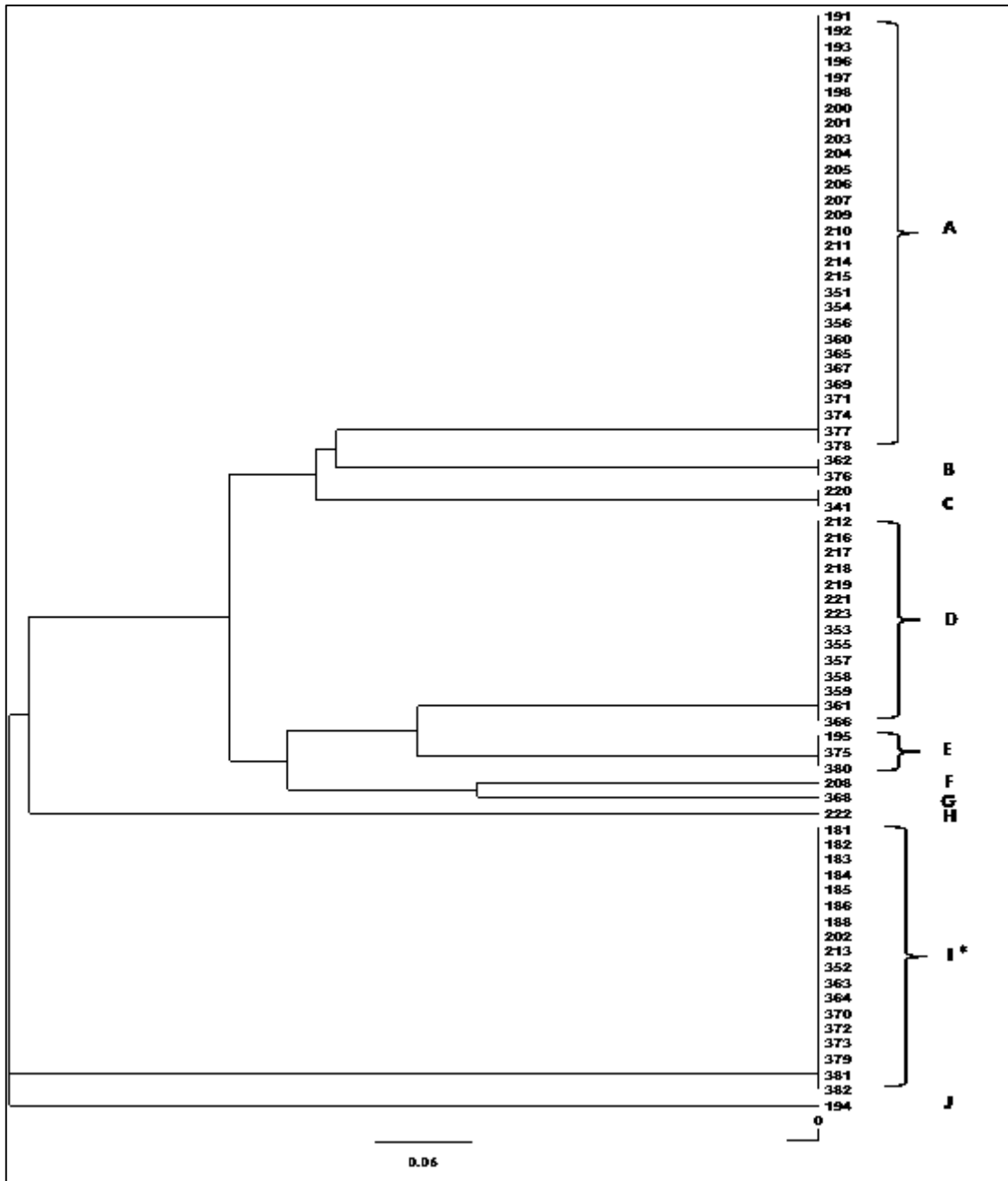


Figura 4. Identificación de alotipos del gen *coa* de *S. aureus* por PCR-RFLP. Se observa el Alotipo I, el cual está asociado estadísticamente a mastitis subclínica bovina. Las cepas MRI222 y MRI194 se lograron discriminar usando PCR-RFLP del gen *coa*.

VII.3.4. DISCUSION.

El sitio polimórfico, es una región donde ocurre variación en la secuencia de aminoácidos de una región determinada del ADN entre los individuos. La identificación de estas variantes alélicas permite predecir las condiciones evolutivas del microorganismo en función a su población y/o posibles cambios en el fenotipo (Lewin, 2008). La diversidad Nucleótido (Pi) es número de diferencias de nucleótido por sitio entre dos secuencias elegidas aleatoriamente y se utiliza para medir el grado de polimorfismo (Nei and Li, 1979).

En un estudio de secuenciación de la región de repetidos (dominio R) de los genes *fnb* y *clf* de clonas epidémicas, MRSA y MSSA, los índices de diversidad para *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB* fueron 0.875, 0.964, 0.628 y 0.679, respetivamente, además, se evidenció la capacidad de las adhesinas *clfA* y *clfB* para tipificar y discriminar de manera concordante a las clonas epidémicas (Gomes *et al.*, 2005). En otro estudio de secuenciación de la región variable de *S. aureus* aislados en comunidad, el índice de discriminación para *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* fue de 89.4, 90.3, 98.1 y 98.4, respectivamente (Lamers *et al.*, 2011). En contraste, nosotros reportamos menores valores de discriminación para *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* (76, 72, 86 y 84, respectivamente) de origen bovino. No obstante, cuando usamos la combinación de adhesinas *fnbA-fnbB-clfA-clfB* y *clfA-clfB* el índice de discriminación se incrementó a 91 y 89, respectivamente. En ese sentido, en este estudio proponemos un método de PCR-RFLP usando la combinación de adhesinas, que resulta ser relativamente económico, rápido y reproducible en comparación con otros métodos de tipificación de *S.aureus* como por ejemplo la secuenciación de adhesinas (Gomes *et al.*,2005; Lamers *et al.*, 2011) u otros genes (Yugueros *et al.*, 1999; Yugueros *et al.*, 2001; Hauschild y Stepanovic, 2008; Awadalla *et al.*, 2010; Blaiotta *et al.*, 2010), PFGE, MLST y MLVA. No obstante, los diversos reportes señalan el bajo índice de discriminación del método de PCR-RFLP en comparación con los métodos de tipificación mencionados anteriormente, lo anterior fue reportado previamente en diversos estudios (Tenover *et al.*, 1994; Malachowa *et al.*, 2005; Vaoutor *et al.*, 2005; Ikawaty *et al.*, 2008; Schouls *et al.*, 2009), por lo cual la combinación de dos o más

adhesinas, a partir de una estrategia bioinformática para la selección de los genes, representa una alternativa para incrementar el valor de discriminación.

En este trabajo, PCR-RFLP del gen *coa* fue empleado como un método de comparación, ya que es un método económico, rápido y reproducible, utilizado ampliamente para discriminar *S. aureus* asociados a comunidad y hospitales (Wertheim *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2007; Himabindu *et al.*, 2009), así como de origen bovino (Rodríguez da Silva y da Silva, 2005; Hata *et al.*, 2010). Nuestros resultados usando PCR-RFLP del gen *coa*, originó genotipos de *S. aureus* consistentes con los alotipos obtenidos usando adhesinas, además, por si solo permitió discriminar algunas cepas que no se discriminaron con PCR-RFLP de adhesinas de manera individual o combinada. Nuestras observaciones fueron consistentes con Ishino *et al.*, 2007, donde demostró la utilidad de PCR-RFLP del gen *coa* para discriminar las cepas M22 y M31 de *S. aureus*, caracterizadas por su resistencia a Arbekacina. Por otro lado, en este estudio reportamos un bajo índice de discriminación de PCR-RFLP del gen *coa* comparado con PCR-RFLP de adhesinas. Esos hallazgos son similares con otros estudios, donde se ha observado bajo índice de discriminación del gen *coa* cuando se le compara con otros métodos de discriminación. Lo anterior se evidencio en un estudio de *S. aureus* aislados en bovinos, donde se reportaron 28 distintos genotipos originados por la digestión de productos de PCR del gen *coa* con la enzima *AluI*, el índice de discriminación fue bajo (ID=0.88) en comparación con MLVA, *spa* typing y MLST (0.97, 0.92, 0.90, respectivamente), no obstante, el método logro mostrar correlación con MLST (Hata *et al.*, 2010).

Existen métodos de genotificación caracterizados por su alto índice de discriminación como PFGE, MLST, MLVA y *spa* typing. A pesar de que en este estudio no se utilizó algún método estándar de oro para la comparación del PCR-RFLP de adhesina, en el laboratorio se realizan análisis de *spa*-typing y MLST con los que se podría continuar su validación para la genotipificación de *S. aureus* de origen bovino.

Un estudio previo de secuenciación de *clfA* de *S. aureus* aislados en casos de mastitis, reveló 20 diferentes clusters; los grupos dominantes (tipos X, Q, C y Z) revelaron la naturaleza clonal de los aislados de mastitis (Said *et al.*, 2010). Nosotros evidenciamos variantes alélicas de adhesinas y esos grupos fueron concordantes independientemente de la adhesina utilizada, además, PCR-RFLP de adhesinas permitió la identificación de cepas de manera individual. A diferencia de lo reportado en la mayoría de publicaciones de genotipificación de aislados de *S. aureus*, reportamos la asociación estadística de los diferentes alotipos de las adhesinas, a la mastitis subclínica bovina. Los diversos alotipos representan la variabilidad genética o polimorfismos en los genes de adhesinas, esa variabilidad podría traducirse en modificaciones con posible relevancia funcional de la proteína (Eidhin *et al.*, 1998; Loughman *et al.*, 2005), lo que significa una ventaja o desventaja en la colonización o virulencia de *S. aureus* (Peacock *et al.*, 2002; Palmqvist *et al.*, 2005).

VII.3.5. CONCLUSION.

Existe un grupo de *S. aureus* con alotipos de adhesinas asociados estadísticamente a la mastitis subclínica bovina; este comportamiento fue similar independientemente de la adhesina utilizada. Lo anterior sugiere la presencia de un grupo de *S. aureus* con un polimorfismo de adhesinas definido, que podría favorecer la colonización, evasión del sistema inmune y el establecimiento de la enfermedad.

La combinación de adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* favorecen el mayor índice de discriminación de PCR RFLP. Lo anterior sugiere un método de discriminación de *S. aureus* reproducible, rápido y económico, útil en laboratorios de diagnóstico voluminoso y de escasos recursos.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL.

La mastitis bovina es una inflamación de la glandula mamaria ocasionada principalmente por *S. aureus* (Saran y Chaffer, 2000; Hata *et al.*, 2010) y *Streptococcus* spp. (Persson *et al.*, 2011). Otro tipo de bacterias como *Escherichia coli* (Bean *et al.*, 2004; Suojala *et al.*, 2011), *Klebsiella* spp. (Munoz *et al.*, 2007) y *Mycoplasma* spp. (Fox *et al.*, 2008), también se les ha reportado como causantes de la inflamación de la glandula mamaria bovina. En años recientes, las especies de SCoN y SIG son considerados patógenos emergentes de la mastitis bovina, debido a su capacidad de infección de la glandula mamaria provocando incremento de células somáticas (Piessens *et al.*, 2012). Sin embargo, es complejo determinar con precisión el agente etiológico responsable de la mastitis bovina, sin considerar la diversidad microbiológica de la ubre bovina, el aspecto fisiológico del animal y las condiciones ambientales, que en conjunto representan variables multifactoriales que desencadenan en determinada momento la mastitis bovina (Fox, 2009), no obstante, los esfuerzos por entender a los microorganismos de manera específica, permiten predecir y controlar el crecimiento de ciertas especies potenciales como *S. aureus*.

El uso de métodos sensibles y rápidos para el aislamiento e identificación de *S. aureus*, SCoN, SIG (Bautista *et al.*, 2013), *Streptococcus* spp. (Yang *et al.*, 2013), Enterobacterias y muchas más (Zadoks *et al.*, 2011), son esenciales para los programas de control y cuidado de la salud de la ubre en vacas lecheras, de tal manera que permiten detectar especies bacterianas eficazmente en comparación con métodos estándar de cultivo, favoreciendo estrategias para controlar la velocidad de crecimiento y contagio en el rebaño lechero. En contraste, en la era moderna de la microbiología, las herramientas de biología molecular como la metagenómica (Oikonomou *et al.*, 2012), el método de electroforesis en gel denaturalizante de amplicones de PCR o PCR-DGGE por sus siglas en inglés (Braem *et al.*, 2012) o la amplificación del gen 16S rRNA usando PCR en tiempo real (Ajitkumar *et al.*, 2012), favorecen una mayor detección de géneros bacterianos para casos específicos, además, representan métodos rápidos y relativamente

económicos comparados con la inversión de un listado de medios de cultivo (Cherkaoui *et al.*, 2007). Sin embargo, las herramientas modernas aun resultan ser ineficaces para el estudio personalizado de la bacteria, sobre todo cuando se requiere el mayor entendimiento de las propiedades de virulencia, además, otra limitante es que se requieren cebadores específicos que incrementan considerablemente su operación (Himabindu *et al.*, 2009; Oikonomou *et al.*, 2012). Por lo tanto, el uso de un método de identificación bacteriana esta sujeto a ventajas y desventajas, no obstante, el método a elegir para la identificación bacteriana dependerá de la pregunta científica establecida y ningún método es excluyente de otro.

Actualmente existe mucho debate sobre el papel que representa SCoN y SIG en la mastitis bovina, ya que suelen ser persistentes en el rebaño lechero (Sampimon *et al.*, 2011) y se les ha asociado con el incremento de células somáticas en la leche (Piessens *et al.*, 2012), en contraste, existe el reporte que cuartos habitados por SCoN, suprimen la colonización de la glándula mamaria por patógenos contagiosos como *S. aureus*, *Streptococcus* spp., y coliformes (Gentilini *et al.*, 2002). Sin embargo, los autores coinciden sobre la interacción e influencia de SCoN y SIG sobre patógenos mayores como *S. aureus*, representando una fuente potencial de genes de virulencia. En este trabajo evidenciamos la presencia de un complejo de *Staphylococcus* asociados estadísticamente a casos de mastitis subclínica y planteamos una alerta epidemiológica basados en la detección de especies de *Staphylococcus* meticilina resistente, con características de multiresistencia hacia diversos tipos de antimicrobianos en casos de mastitis subclínica bovina. No reportamos información acerca de la población bacteriana en casos de mastitis clínica y de vacas sanas, debido al bajo número de muestras obtenidas durante el muestreo, que podían favorecer el sesgo estadístico, lo anterior debido a la tipología del sistema de producción de lechería familiar, en los que la presencia de vacas con mastitis clínica y el número de cuartos sanos son escasos, por lo cual los estudios podrían continuar. A diferencia de nosotros, Braem *et al.*, 2012, reportaron igual porcentaje de colonización de especies de *Staphylococcus* en la teta de vacas no infectadas e infectadas clínica y subclínicamente. Sin embargo, en otro estudio se

demostró el aislamiento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprophyticus* solamente en casos de mastitis subclínica bovina, mientras que *S. hyicus* fue aislado solo en casos de mastitis clínica bovina, evidenciando la variación de especies de *Staphylococcus* en función al tipo de patología (Persson *et al.*, 2011). Los estudios anteriores refuerzan la continuación del estudio, extendiendo el nivel de muestreo a un mayor número de regiones de granjas de lechería familiar o en su caso invitan a plantear una nueva pregunta en otro tipo de sistemas de producción lechera, en donde podría aplicarse el modelo de investigación propuesto en este trabajo.

El análisis de PCR-RFLP de los genes *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB* originaron nuevas expectativas para el planteamiento de un método de tipificación con aceptable poder de discriminación, además, permitieron establecer grupos de variabilidad alélica o polimorfismos de las adhesinas utilizadas en *S. aureus*, que contribuye a entender de mejor manera las relaciones genéticas y de virulencia de esos alotipos. Gomes *et al.*, 2005, utilizó la secuenciación del dominio R de *clfA* y *clfB*, y las regiones D, W y M de los genes *fnbA* y *fnbB*, confirmando al igual que nosotros, el aceptable poder de discriminación de las adhesinas para ser utilizadas como una herramienta de tipificación de *S. aureus*. La herramienta de tipificación de *S. aureus* basado en adhesinas, permitiría vigilar y detectar ciertas clonas epidémicas dentro de la comunidad de manera rápida y económica.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL.

En esta tesis, el agar sal y manitol permitió aislar e identificar eficientemente *S. aureus* en casos de mastitis subclínica bovina y establecimos el uso de la secuenciación de la región 3 del gen (*rrs*) 16S rRNA como prueba de oro para la comparación de métodos de aislamiento e identificación de bacterias en el futuro. Por otro lado, concluimos que *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. sciuri* y *S. hominis* se asociaron estadísticamente con la mastitis subclínica bovina, además, algunas cepas de este grupo contienen genes asociados a elementos genéticos móviles como *pvl* y el gen *mecA*. Lo anterior evidencia un complejo microbiano competente que dificulta la quimioterapia en las granjas de traspatio.

En relación a *S. aureus*, existe un grupo de alelos asociados estadísticamente a la mastitis subclínica bovina y este comportamiento fue constante independientemente de la adhesina utilizada. Lo anterior sugiere la presencia de un grupo de *S. aureus* que coexiste compartiendo características para la evasión del sistema inmune y el establecimiento de la enfermedad. En otro aspecto, el método de PCR-RFLP usando la combinación de adhesinas *fnbA*, *fnbB*, *clfA* y *clfB*, favorecen el mayor poder de discriminación. Lo anterior sugiere un método de discriminación de *S. aureus* reproducible, rápido y económico, útil en laboratorios de diagnóstico voluminoso y de escasos recursos.

El presente trabajo fundamenta las bases de futuras preguntas científicas que ayuden al control eficiente de patógenos de la mastitis bovina, como por ejemplo la formulación de estudios para producir anticuerpos policlonales contra cepas de variantes alélicas predominantes, hacer un esfuerzo por correlacionar variantes alélicas específicas con la capacidad de inducir la respuesta inflamatoria o con la susceptibilidad de ser fagocitados. Por último, realizar estudios de señalización química y regulación de la virulencia de *S. aureus* con variantes alélicas específicas.

X. REFERENCIAS

- Aires-de-Sousa, M., Boye, K., de Lencastre, H., Deplano, A., Enright, M.C., et al. (2006).** High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol.* **44**(2):619-621.
- Aires de Sousa, M., Parente, C.E., Vieira-da-Motta, O., Bonna, I.C, et al. (2007).** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro state, Brazil, *App and Environ Microbiol.* **73**(12):3845-3849.
- Ajitkumar, P., Barkema, H. W., De Buck, J. (2012).** Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences. *Vet Microbiol.* **155**:332-340.
- Awadalla, H.I., Khalil, I.A., Bassim, H.H., Ahmed, M.N., Wahba, L.M. (2010).** Molecular typing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at Ain Shams University Hospital, Egypt. *Afric J Microbiol Res.* **4**(15):1639-1646.
- Baird-Parker, A.C. (1962).** An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *J Appl Bacteriol.* **25**:12-19.
- Baizabal, A.V., Oviedo, J., Valdez, J.J., Bravo, A. Cajero, J. (2009).** Caracterización funcional de la interacción entre estructuras observadas de *Staphylococcus aureus* y receptores celulares. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXXIII.pp????
- Bannoehr, J.N., Ben Zakour, L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., et al. (2007).** Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol.* **189**:8685-8692.
- Bannoehr, J., Franco, A., Lurescia, M., Battisti, A., Fitzgerald, J.R. (2009).** Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol.* **47**(2):469-471.
- Barbu, E. M., Vannakambadi, K., Gurusiddappa, S., Mackenzie, C., Foster, T., Sudhof, T., Hook, M. (2010).** Beta-Neurexin is a ligand for the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM SdrC. *PLoS Pathogens.* **6**(1):1000726.

- Bautista, T.G., Solorio, R.J., Rentería, S.I., Carranza, G.S., Bustos, M.J., Arteaga, G.R., Baizabal, A.V., Cajero, J.M., Bravo, P.A., Valdez, A.J. (2013).** Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol.* **62**:369-376.
- Bean, A., Williamson, J., Cursons, R. T. (2004).** Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J Vet Med B.* **51**(6):285-287.
- Ben Zakour, N.L., Bannoehr, J., van den Broek, A.H., Thoday, K.L., Fitzgerald, J.R. (2011).** Complete genome sequence of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Bacteriol.* **193**(9):2363-2364.
- Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G., von Eiff, C. (2004).** Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species. *J Clin Microbiol.* **42**:4988-4995.
- Berglund, C., Soderquist, B. (2008).** The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden-possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome mec between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* **14**:1048-56.
- Bhutto, A. L., Murray, L. D., Woldehiwet, Z. (2012)** California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Res Vet Sci.* **92**:13-17.
- Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Pepe, O., Coppola, S. (2010).** Diversity of *Staphylococcus* Species strains based on partial *kat* (Catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J Clin Microbiol.* **48**(1):192-201.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, E., Moschetti, G., Villani, F. (2003).** Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S–23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of

- staphylococci from Italian fermented sausages. *Syst Appl Microbiol.* **26**:423-433.
- Boden, M., Flock, J. (1994).** Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **12**(4):599-606.
- Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüsey, D., Schaellibaum, M. (2003).** Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *J Clin Microbiol.* **41**:767-771.
- Boles, B. R., Horswill, A. R. (2008).** agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathog.* **4**(4):e1000052. doi:10.1371/journal.ppat.1000052.
- Boyce, J. M., Havill, N. L. (2008).** Comparison of BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR versus the CHROMagar MRSA assay for screening patients for the presence of MRSA strains. *J Clin Microbiol.* **46**: 350-351.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., et al. (2009).** Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet Microbiol.* **135**:187-195.
- Braem, G., De Vliegher, S., Verbist, B., Heyndrickx, M., Leroy, F., De Vuyst, L. (2012)** Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet Microbiol.* **157**:383-390.
- Brody, T., Yavatkar, A.S., Lin, Y., Ross, J., Kuzin, A., et al. (2008).** Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS ONE.* **3**(8):e3074. doi:10.1371/journal.pone.0003074.
- Brown, J. H. (1919).** The use of blood agar for the study of streptococci. NY Monograph 9. The Rockefeller Institute for Medical Research.
- Burke, F. M., McCormack, N., Rindi, S., Speziale, P., Timothy, J. F. (2010).** RFeisbearroch arnteiclectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **10**:160.

- Bustos, M. J., Hamdan, A., Gutiérrez, M. (2006).** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*. **17**:287-305.
- Caetano, M.A., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., Finlay, B.B. (2010).** Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol*. **156**:2271-2282.
- Carricajo, A., Treny, A., Fonsale, N., Bes, M., Reverdy, M. E., Gille, Y., Aubert, G., Freydiere, A. M. (2001).** Performance of the chromogenic medium CHROMagar Staph aureus and the Staphychrom coagulase test in the detection and identification of *Staphylococcus aureus* in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. **39**:2581-2583.
- Chan, P. F., Foster, S. J. (1998).** Role of SarA in Virulence Determinant Production and Environmental Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*. *J bacteriol*. **180**(23):6232-6241.
- Cheng, A., Kim, H., Burts, M., Krausz, T., Schneewind, O., Missiakas, D. (2009).** Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *J Fed Am Soc Exp Biol*. **23**(10):3393–3404.
- Cherkaoui, A., Renzi, G., Francois, P., Schrenzel, J. (2007).** Comparison of four chromogenic media for culturebased screening of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*. **56**: 500-503.
- Chuang, C.Y., Yang, Y.L., Hsueh, P.R., Lee, P.I. (2010).** Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *J Clin Microbiol*. **48**(4):1497-1498.
- CLSI: (2009).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Contreras, G.A., Rodríguez, J.M. (2011).** Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **16**:339-356.
- Corrigan, R., Miajlovic, H., Foster, T. (2009).** Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol*. **9**:22 doi:10.1186/1471-2180-9-22.

- Couto, I., de Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., et al. (1996).** Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist.* **2**:377-391.
- Cuny, C., Layer, F., Strommenger, B., Witte, W. (2011).** Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS ONE.* **6**(9):e24360. doi:10.1371/journal.pone.0024360.
- De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M. (2000).** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci.* **83**:855-62.
- Diep, B.A., Otto, M. (2008).** The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* **16**:361-369.
- Dufour, P., Gillet, Y., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., et al. (2002).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: Emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* **35**:819-824.
- Eidhin, D.N., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., Foster, T.J. (1998).** Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **30**(2):245-257.
- El-Mahdy, T.S., El-Ahmady, M., Goering, R.V. (2014).** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated over a 2-year period in a Qatari hospital from multinational patients. *Clin Microbiol Infect.* **20**:169-173.
- El-Sayed, A., Alber, J., Lämmle, C., Jäger, S., Wolter, W., Castañeda-Vázquez, H. (2006).** Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in México. *Veterinaria México.* **37**:165-179.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G. (2000).** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **38**:1008-1015.

- Ericsson, U. H., Lindhberg, A., Waller, K. P., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., Bengtsson, B. (2009)** Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet Microbiol.* **137**:90-97.
- Espinoza, G. J. A., Wiggind, S., González, A. T., Aguilar, U. (2004).** Economic sustainability at the farm level: a study on family milk production enterprises in México. *Tec Pecu Mex.* **42**:55-70.
- Evagrio, G., Niraj, P., Qi, W., Pyong, K., Konstantopoulos, K., Ross, J. (2006).** *Staphylococcus aureus* Adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to Immobilized Platelets Demonstrates Shear-Dependent Behavior. *Arterioscl Thromb Vascular Biol.* **26**:2394-2400.
- Faria, N.A., Carrico, J.A., Oliveira, D.C., Ramirez, M., de Lencastre, H. (2008).** Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* **46**(1):136-144.
- Feßler, A.T., Billerbeck, C., Kadlec, K., Schwarz, S. (2010).** Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother.* **65**:1576-1582.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V. (1997).** Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect.* **119**:261-269.
- Florence, B., Fromageau, A., Gélineau, L., Poutrel, B. (2006).** Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat Typing. *Vet Microbiol.* **117**; 2-4:297-303.
- Fox, L.K., Muller, F.J., Wedam, M.L., Schneider, C.S., Biddle, M.K. (2008).** Clinical *Mycoplasma bovis* mastitis in prepubertal heifers on 2 dairy herds. *Can Vet J.* **49**:1110-1112.
- Fox, L. K. (2009).** Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet Microbiol.* **134**:82-88.
- Fraunholz, M., Sinha, B. (2012).** Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Inf Microbiol.* **2**(43).

- Gaillot, O., Wetsch, M., Fortineau, N., Berche, P. (2000).** Evaluation of CHROMagar *Staph. aureus*, a new chromogenic medium, for isolation and presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **38**:1587-1591.
- Ganesh, V., Rivera, J., Smeds, E., Ko, Y., Bowden, M. (2008).** A Structural Model of the *Staphylococcus aureus* ClfA–Fibrinogen Interaction Opens New Avenues for the Design of Anti-Staphylococcal Therapeutics. *PLoS Pathogen.* **4**(11): e1000226. doi:10.1371/journal.ppat.1000226.
- Garcia, A.L., Holden, M.T., Lindsay, H., Webb, C., et al. (2011).** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* **11**:595-603.
- Garza, G.E., López, D., Pezina, C., Muruet, W., et al. (2010).** Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in coagulase-negative staphylococci and relationship to drug resistance. *J Clin Microbiol.* **59**:323-329.
- Garzoni, C., Kelley, W.L. (2008).** *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends in Microbiology.* **17**(2).
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B. (2008)** Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on differential partial *gap*, 16S rDNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J Clin Microbiol.* **46**:1019-1025.
- Gillespie, B.E., Headrick, S.I., Boonyayatra, S., Oliver, S.P. (2009).** Prevalence and persistence of coagulase-negative staphylococcus species in three dairy research herds. *Vet Microbiol.* **134**:65-72.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., et al. (2002).** Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* **359**:753-759.
- Gomes, A.R., Vinga, S., Zavolan, M., de Lencastre, H. (2005).** Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus*. Antim agents and chemotherapy. **49**(1):366-379.
- Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D., Wagenaar, J. A. (2011)** Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int J Med Microbiol.* **301**:630-634.
- Grundmeier, M., Hussain, M., Becker, P., Heilmann, C., Peters, G., Sinha, B. (2004).** Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect and immunity.* **72**(2):7155-7163.
- Habib, D. S. (2010).** Distribution of collagen adhesin gene among various types of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mammary gland. *Comparative Clin Pathol.* DOI: 10.1007/s00580-010-1136-9.
- Hallin, M., Denis, O., Deplano, A., De Ryck, R., Crevecoeur, S., Rottiers, S., de Mendonc, R., Struelens, M. (2008).** Evolutionary relationships between sporadic and epidemic strains of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infected.* **14**:659-669.
- Han, Z., Lautenbach, E., Fishman, N., Nachamkin, I. (2007).** Evaluation of mannitol salt agar, CHROMagar Staph aureus and CHROMagar MRSA for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal swab specimens. *J Med Microbiol.* **56**:43-46.
- Hamdan, P.A., Sainz, E.T., Bustos, M.J. (2010).** Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J Clin Microbiol.* **48**(5):1701-1705.
- Hata, E. K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., Eguchi, M. (2010).** Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J Clin Microbiol.* **48**: 2130-2139.
- Haupt, K., Reuter, M., Elsen, J., Burman, J., Ibich, S., Richter, J., Skerka, C., Zipfel, P.F. (2008).** The *Staphylococcus aureus* Protein Sbi Acts as a Complement Inhibitor and Forms a Tripartite Complex with Host Complement

- Factor H and C3b. *PLoS Pathogens*. **4**(12): e1000250. doi:10.1371/journal.ppat.1000250.
- Hauschild, T., Stepanovic, S. (2008).** Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. *J Clin Microbiol*. **46**(12): 3875-3879.
- Henderson, B., Nair, S., Pallas, J., Williams, M.A. (2010).** Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbiol Rev*. **35**:147-200.
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J., Musser, J., Kapur, Y.W. (2007).** Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PloS ONE* **2**(10):e1120. doi:10.1371/journal.pone.0001120.
- Himabindu, M., Sugapriya, M.D., Kumar, B.D., Verma, R.S. (2009).** Molecular analysis of coagulase gene polymorphism in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism based genotyping. *Amer J Infect Dis*. **5**(2):163-169.
- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., et al. (2013).** Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infect Chemother*. **45**(2):117-136.
- Holmes, M.A., Zadoks, R.N. (2011).** Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **16**:373-382.
- Hookey, J.V., Richardson, J.F., Cookson, B.D. (1998).** Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol*. **36**(4):1083-1089.
- Huber, H., Ziegler, D., Pflüger, V., Vogel, G., et al. (2011).** Prevalence and characteristics of methicillin resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res*. **7**:6.
- Ikawaty, R., Willems, R., Box, A., Verhoef, J., Fluit, A. (2008).** Novel multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis method for rapid molecular typing of human *S. aureus*. *J Clin Microbiol*. **46**(9): 3147-3151

- Ishino, K., Tsuchizaki, N., Ishikawa, J., Hotta, K. (2007).** Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* **45**(2):607-609.
- Kahl, B.C., Mellmann, A., Deiwick, S., Peters, G., Harmsen, D. (2005).** Variation of the polymorphic region X of the protein A gene during persistent airway infection of cystic fibrosis patients reflects two independent mechanisms of genetic change in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 502-505.
- Karahan, M., Cetinkaya, B. (2007).** Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *The Vet J.* **174**: 428-431.
- Kateete, D. P., Kimani, C. N., Kutabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., Joloba, M. L., Najjuka F. C. (2010).** Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals Clin Microbiol Antimicrob.* **9**:23.
- Keane, F.M., Loughman, A., Valtulina, V., Brennan, M., Speziale, P., Foster, T.J. (2007).** Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **63**(3): 711-723.
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A., Kreiswirth, B.N. (2005).** Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **43**(8):3985-3994.
- Kreienbuehl, L., Charbonney, E., Eggimann, P. (2011).** Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. *Ann of Int Care.* **1**:52.
- Krishna, T., Ranjan, M. (2006).** Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis.* **6**:156.

- Lamers, R.P., Stinnett, J.W., Muthukrishnan, G., Parkinson, C.L., Cole, A.M. (2011).** Evolutionary Analyses of *Staphylococcus aureus* Identify Genetic Relationships between Nasal Carriage and Clinical Isolates. *PLoS ONE*. **6**(1): e16426. doi:10.1371/journal.pone.0016426
- Landis, J. R., Koch, G. G. (1977).** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. **33**:159-174.
- Lawrence, Y., Miyamoto, Y., McIntyre, B., Höök, M., Kirk, W., McDevitt, D., Brown, E. (2002).** The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest*. **110**(10):1461-71.
- Lazar, Istvan. (2010).** GelAnalyzer. Versión 2010a.freeware.
- Lee, D. H., Young, G. Z., Sang, J. K. (1996).** Non-radioactive method to study the genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol*. **62**:3112-3120.
- Lewin, B. (2008).** Genes IX. McGrawHill. 28-57pp.
- Librado, P., Rosas, J. (2009).** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. **25**:1451-1452.
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, B., et al. (1999).** Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*. **29**:1128-32.
- Lindsay, J., Holden, M. (2004).** *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome?. *Trends in Microbiol*. **12**:8.
- Lindsay, J., Holden, M. (2006).** Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integrative Genomics*. **6**:186-201.
- Loughman, A.J., Fitzgerald, J.R., Brennan, M.P., Higgins, J., Downer, R., Cox, D., Foster, T.J. (2005).** Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol*. **57**(3):804-81.
- Maiden, M.C.J. (2006).** Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. **60**:561-88.

- Malachowa, N., Sabat, A., Gniadkowski, M., Russjan, J.K., et al. (2005).** Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* **43**(7):3095-3100.
- Maor, Y., Hagin, M., Belausov, N., Keller, N., Ben-David, D., Rahav, G. (2009).** Clinical Features of Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Bacteremia versus Those of Methicillin-Resistant *S. aureus* Bacteremia. *J Infect Dis.* **199**:619-24.
- Martineau, F., Picard, F., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron M. G. (1998)** Species-specific and ubiquitous-DNA-based assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **36**: 618-623.
- Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron M.G. (2001)** Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol.* **39**:2541-2547.
- McCarthy, A.J, Lindsay, J.A. (2010).** Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol.* **10**:173.
- Meenan, N.A., Visai, L., Valtulina, V., Schwarz-Linek, U., Norris, N.C., Gurusiddappa, S., Höök, M., Speziale, P., Potts, J.R. (2007).** The tandem β -zipper model defines high affinity fibronectin-binding repeats within *Staphylococcus aureus* FnBPA. *J Biol Chem.* **282**(35):25893-25902.
- Miller, L. G., Diep, B. A. (2008).** Colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* **46**:752-760.
- Miranda, M.R., Rojas, T.V., Segura, C.R., Carrillo, C.E., et al. (2008).** Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in México. *Ann N Y Acad Sci.* **1149**:300-2.
- Munoz, M. A., Welcome, F. L., Schukken, Y. H., Zadoks, R. N. (2007).** Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3964-3971.

- Musta, A. C., Riederer, K., Shemes, S., Chase, P., Jinson, J., Johnson, L. B., Khatib, R. (2009).** Vancomycin MIC plus Heteroresistance and Outcome of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Trends over 11 Years. *J Clin Microbiol.* 1640-1644.
- Nahimana, I., Francioli, P., Blanc, D. S. (2006).** Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* **12**:1168-1174.
- National Mastitis Council. (1999).** Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Rev. ed. National Mastitis Council, Madison, WI.
- Nei, M., Li, W. (1979).** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings National Academy Sciences. USA **76**:5269-5273.
- Nienhoff, U., Kadlec, K., Chaberny, L., Verspohl, J., et al. (2011).** Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among cats admitted to a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.* **153**:414-416.
- Nuryastuti, T., Van der Mei, H., Busscher, H., Iravati, S., Aman, A., Krom, B. (2009).** Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol.* **75**(21):6850-5.
- O'Hara, F., Guex, N., Word, J., Miller, L., Becker, J., Walsh, S., et al. (2008).** A geographic variant of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin Toxin and the origin of the community-associated methicillin-resistant *S. aureus* USA300. *J Infect Dis.* **197**:187-194.
- Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K.P., Hell, W., Wichelhaus, T., y Hacker, J. (1998).** Effects of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Alpha-Toxin (*hla*) Gene Expression of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antim agents and chemothe.* **42**(11):2817-2823.
- Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H., Bicalho, R, C. (2012).** Microbial Diversity of Bovine Mastitic Milk as Described by

- Pyrosequencing of Metagenomic 16s DNA. *PLoS ONE*. **7**(10): e47671. doi:10.1371/journal.pone.0047671.
- Oliveira, D.C., Lencastre, H. (2002).** Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2155-2161.
- Oliveira, D.C., Milheiri, C., Vinga, S., Lencastre, H. (2006).** Assessment of allelic variation in the ccrAB locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Antimicrob Chemother*. **58**:23-30.
- Ollis, G.W., Rawluk, S. A., Schoonderwoerd, M., Shipper, C. (1995).** Detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. *Can Vet J*. **36**:619-623.
- O'Neill, A.J., Larsen, A.R., Skov, R., Henriksen, A.S., Chopra, I. (2007).** Characterization of the epidemic european fusidic acid-resistant impetigo clone of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. **45**:1505-10.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D.A., Loughman, A., Foster, T.J., O'Gara, J.P. (2008).** A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J bacteriol*. **190**(11):3835-3850.
- Oonagh, S., Flock, J.I. (2004).** Extracellular fibrinogen bindingprotein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibitsplatelet aggregation. *Thromb and Haemostasis*. **91**: 779-89. 2004.
- Page, R.D.M. (1996).** TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Cabios Applicat Note*. **12**(4):357-358.
- Palmqvist, N., Foster, T., Fitzgerald, J.R., Josefsson, E., Tarkowski, A. (2005).** Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in Staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Infect Dis*. **191**:791-8.
- Pavlíček, A., Hrda, S., Flegr, J. (1999).** Free-tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol*. **45**(3):97-9.

- Pantucek, R., Sedlacek, I., Petras, P., Koukalova, D., Svec, P., Stetina, V., et al. (2005)** *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**:1953-1958.
- Paterson, G.K., Harrison, E.M., Craven, E.F., Petersen, A., et al. (2013).** Incidence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Nasal colonization in participants attending a cattle veterinary conference in the UK. *PLoS ONE.* **8**(7): e68463. doi:10.1371/journal.pone.0068463.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., Day, N.P.J. (2002).** Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity.* **70**(9):4987-4996.
- Perry, J. D., Rennison, C., Butterworth, L. A., Hopley, A. L. J., Gould, F. K. (2003).** Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **41**:5695-5698.
- Perry, J. D., Freydière, A. M. (2007).** The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J App Microbiol.* **103**: 2046-2055.
- Persson, W.K., Aspán, A., Nyman, A., Persson, Y., Grönlund, A. (2011a).** CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet Microbiol.* **152**:112-116.
- Persson, Y., Nyman, A.K.J., Grönlund-Andersson, U. (2011).** Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* **53**:36.
- Piessens, V., De Vliegher, S., Verbist, B., Braem, G., et al. (2012).** Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase negative *staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. *Vet Microbiol.* **155**:62-71.
- Pletinckx, L. J., De Bleecker, Y., Dewulf, J., Rasschaert, G., Goddeeris, B. M., De Man, I. (2012).** Evaluation of salt concentrations, chromogenic media and anatomical sampling sites for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* **154**:363-368.

- Pyörälä, S., Taponen, S. (2009).** Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* **134**:3-8.
- Rice, D. N. (1997).** Using the California mastitis test (CMT) to detect subclinical mastitis. Bulletin G81-556A. Nebguide Publication. University of Nebraska.
- Ritter, V., Kircher, S., Sturm, K., Warns, P., Dick, N. (2009).** Evaluation of BD BBL™ CHROMagar™ Staph aureus medium using AOAC and ISO culture methods. *J AOAC Int.* **92**:1432-1453.
- Rodríguez da Silva, E., da Silva, N. (2005).** Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res.* **69**:260-264.
- Rybak, M. J., Leonard, S. N., Rossi, K.L., Cheung, C.M., Sadar, H.S., Jones, R.N. (2008).** Characterization of Vancomycin-Heteroresistant *Staphylococcus aureus* from the Metropolitan Area of Detroit, Michigan, over a 22-Year Period (1986 to 2007). *J Clin Microbiol.* 2950-2954.
- Sabat, A., J., Strzalka, R.W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J., Potempa, J. (2003).** New Method for Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* **41**(4):1801-1804.
- Sabat, A., Melles, C.D., Martirosian, G., Grundmann, H., Van Belkum, A., Hryniewicz, W. (2006).** Distribution of the Serine-Aspartate Repeat Protein-Encoding sdr Genes among Nasal-Carriage and Invasive *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol.* 1135-1138.
- Said, K.B., Ismail, J., Campbell, J., Mulvey, M.R., Bourgault, A.M., Messier, S., Zhao, X. (2010).** Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific *Staphylococcus aureus* lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and *spa* typing. *J Clin Microbiol.* **48**(10): 375-386.
- Sampimon, O.C., Barkema, H.W., Berends, I.M., Sol, J., Lam, T.J. (2009).** Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with

- coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet Microbiol.* **134**:37-44.
- Sánchez, G. L. G., Solorio, J. L., Santos, F. J., Castelan, O. A. (2004a).** Determination of the principal components in the family dairy milk system in the central región of the State of Michoacán, México. Abstracts 8th Pan-American Dairy Congress. Pan-American Dairy Federation. Miami Beach, USA. 23-25, 18.
- Sánchez, G. L. G., Solorio, J. L. (2004).** Description of the bovine farming system in Cotzio and Tájaro, Michoacán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UADY. Mérida, Yucatán. P. 58.
- Saran, A., Chaffer, M. (2000).** Mastitis y calidad de la leche. Ed. Inter-Medica. Buenos Aires. pp. 14-16, 31-42.
- Schouls, L.M., Spalburg, E.C., van Luit, M., Huijsdens, X.W., Pluister, G.N., et al. (2009).** Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: Comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *spa*-typing. PLoS ONE. **4**(4): e5082. doi:10.1371/journal.pone.0005082.
- SIAP-SAGARPA. (2012).** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera; Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación.
- Sinha, B., Herrmann, M. (2005).** Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb and Haemost.* **94**: 266-277.
- Sitkiewicz, I., Babiak, I., Hryniewicz, W. (2010).** Characterization of transcription within *sdr* region of *Staphylococcus aureus*. Short communication. Antonie van Leeuwenhoek. DOI 10.1007/s10482-010-9476-7.
- Smeltzer, M.S., Gillaspay, A.F., Pratt, F.L., Thames, M.D. (1997).** Comparative evaluation of use of *cna*, *fnbA*, *fnbB*, and *hly* for genomic fingerprinting in the epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **35**(10):2444.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994)** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J. Syst Bacteriol.* **44**: 846-849.

- Staley, J. T. (2006).** The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Proc Trans R Soc B*. **361**:1899-1909.
- Struelens, M.J., Hawkey, P.M., French, G.L., Witte, W., Tacconelli, E. (2009).** Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect*. **15**:112-119.
- Stuts, K., Stephan, R., Tasara, T. (2011).** SpA, ClfA and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. **49**: 638-646.
- Suojalaa, L., Pohjanvirta, T., Simojokia, H., Myllyniemi, A., Pitkälä, A., Pelkonen, S., Pyörälä, S. (2011).** Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet Microbiol*. **147**;3-4:383-388.
- Takahashi, I. S., Kikuchi, N. (1999).** Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based in 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*. **49**: 725-728.
- Tamura, K., Glen, S., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molec Biol Evol*: **30**: 2725-2729.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., et al. (1994).** Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. **32**(2):407-415.
- Turner, K.M.E., Feil, E.J. (2007).** The secret life of the multilocus sequence type. *Int J Ant Agents*. **29**:129-135.
- Valdez, J.J., Bustos, J.A., Baizabal, V.M., Bravo, A., Chávez, M.P., Cajero, M. (2014).** *Staphylococcus aureus* asociado a la mastitis bovina: un enfoque epidemiológico-funcional. En: Castañeda-Vázquez H. y Velázquez-Ordoñez V. Producción y calidad de la leche. Red Internacional de Cuerpos Académicos en Salud Animal e Inocuidad Alimentaria – Universidad Autónoma del Estado de México. 2014. ISBN en trámite.

- Vaoutor, E., Jay, C., Chevalier, N., Visomblin, N. et al. (2005).** Characterization of 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, predominantly from dairy sheep, using four different techniques of molecular epidemiology. *J Vet Diagn Invest.* **17**:363-368.
- Ünal, N., Doğu, O.Ç. (2012).** Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod.* **44**:369-375.
- Unnerstad, H.E., Bengtsson, B., Horn af Rantzien, M., Börjesson, S. (2013).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. *Acta Vet Scand.* **55**:6.
- Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Boel, A., Vaerenberg, K.V., Beenhouwer, HD. (2006).** First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol.* **44**:4609-4612.
- Velázquez, M. (2005).** Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilinoresistente. *Salud Pública México.* **47**:381-7.
- Walther, B., Hermes, J., Cuny, C., Wieler, L.H., Vincze, S., et al. (2012).** Sharing more than friendship-nasal colonization with coagulase-positive Staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. *PLoS ONE.* **7**(4):e35197. doi:10.1371/journal.pone.0035197.
- Wang, Y., Wu, C. M., Lu, L. M., Ren, G. W. N., Cao, X. Y., Shen, J. Z. (2008).** Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol.* **130**:118-125.
- Wertheim, H.F., Verveer, J., Boelens, H.A., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Vos, M.C. (2005).** Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antim agents and chemotherapy.* **49**(4):1465-1467.
- Widemauwe, C., Godard, C., Verschraegen, G., et al. (2001).** Ten years phage-typing of Belgian clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates

- (1992–2001). *J Hosp Infect.* 2004; 56:16-21. *J Clin Microbiol.* **39**(10): 3693-3695.
- Wielders, C.L., Vriens, M.R., Brisse, S., de Graaf-Miltenburg, L.A., et al. (2001).** In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **357**:674-5.
- Yang, Y., Liu, Y., Ding, Y., Yi, L., Ma, Z., Fan, H., Lu, C. (2013).** Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis in Eastern China. *PLoS ONE* **8**(7): e67755. doi:10.1371/journal.pone.0067755.
- Yugueros, J., Soriano, A., Sánchez, M., Hernánz, M., Suárez, S., Smeltzer, M., Naharro, C. (1999).** Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* Gene. *J Clin Microbiol.* **37**(3):570-574.
- Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Luengo, J.M., Naharro, G. (2001).** Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-Restriction fragment length polymorphism of *gap* gene. *J Clin Microbiol.* **39**(10):3693-3695.
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y. H. (2011)** Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **16**: 357-372.
- Zaneveld, J.R., Nemergut, D.R., Knight, R. (2008).** Are all horizontal gene transfers created equal? prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiol.* **154**:1-15.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra, V., Piccinini, R. (2006).** Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogens.* **40**:177-183.
- Zecconi, A., Scali, F. (2013).** *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett.* **150**(1-2):12-22.
- Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J.M. (2008).** Novel multiplex PCR assay for simultaneous identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains USA300 and USA400 and detection of *mecA* and Panton-Valentine leukocidin genes, with discrimination

of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1118-1122.

Zivkovic, A., Sharif, O., Stich, K., Doninger, B., et al. (2011). TLR2 and CD14 mediate innate immunity and lung inflammation to staphylococcal Panton–Valentine leukocidin in vivo. *J Immunol.* **186**:1608-1617.