



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

VARIACIÓN GENÉTICA DEL ANTIBIOTIPO  
METICILINA RESISTENTE DE AISLAMIENTOS DE  
*Staphylococcus aureus* DE ORIGEN BOVINO EN EL  
VALLE DE TOLUCA

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

MVZ. MARGARITA LÓPEZ VÁZQUEZ

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE DEL 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

VARIACIÓN GENÉTICA DEL ANTIBIOTIPO METICILINA  
RESISTENTE DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus*  
DE ORIGEN BOVINO EN EL VALLE DE TOLUCA

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

MVZ. MARGARITA LÓPEZ VÁZQUEZ

COMITÉ DE TUTORES

DIRECTOR DE TESIS

DR. VALENTE VELÁZQUEZ ORDOÑEZ

ASESORES

DR. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA

DR. MARTIN TALAVERA ROJAS

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE DEL 2013

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de registro becario 265008, para cursar los estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca de titulación otorgada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la Beca Mixta 2012-2013 movilidad en el extranjero para la realización de una estancia en la Universidad de La Rioja, España.

A la beca de Apoyos Complementarios para Mujeres Indígenas Becarias CONACYT 2012.

Al Proyecto de Investigación: Caracterización genotípica de *Staphylococcus aureus* de tipo capsular en aislamientos obtenidos de hatos lecheros de producción familiar del valle de Toluca. PROMEP: fortalecimiento de cuerpos académicos 2010.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, por las facilidades otorgadas en la realización del presente trabajo.

Al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por su apoyo en la estancia de capacitación en técnicas moleculares.

Al Área de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Agricultura y Alimentación, de la Universidad de La Rioja, España, por su apoyo en la tipificación molecular de aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

A mis asesores Dr. Valente Velázquez Ordoñez, Dr. José Simón Martínez Castañeda y al Dr. Martín Talavera Rojas por el apoyo y tiempo que brindaron para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Carmen Torres Manrique y al Dr. Juan José Valdéz Alarcón gracias por la atención y disponibilidad para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Uxúa Alonso Fresan, por su apoyo durante el curso de la maestría.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **Diosito**, gracias por darme la vida, mi familia, amigos y todo lo que tengo te lo debo a ti.

A mis padres: **Elia y Lito**, gracias por su amor, apoyo y por estar a mi lado siempre.

A mis hermanas: **Sandy y Lalis**, quienes a través de los años me han brindado su apoyo y por la paciencia que me han tenido (je je je).

A mi sobrino **Uriel**, porque cada día me recuerda que es mejor sonreírle a la vida y que las cosas sencillas son las más importantes.

A mis tíos: **Neta y Alfredo** gracias por sus consejos.

A mi amigo **Mario**, por los años de amistad compartidos, gracias por escucharme y por tus consejos.

A **Ana y Nancy**, gracias por ser parte de esta travesía en el CIESA, por los muestreos, los congresos, las clases de salsa en el lab, y porque las horas de trabajo se me hacían más agradables con ustedes.

A **Raque y Saúl**, gracias por su amistad, su apoyo y las porras que siempre me dan.

A los **CIESES**, que en estos años conformamos un buen equipo, además de ser amigos.

A **Juanis**, gracias amiguita por tu apoyo.

A **Liz y Silvia**, gracias por su tiempo y sus consejos.

A **Gerardo Uriel**, gracias por el apoyo brindado en mi estancia en la Universidad Michoacana.

A **Paula**, muchas gracias por el tiempo y disponibilidad que me brindaste para aprender los métodos para tipar a *S. aureus*, además de inculcarme cariño por los demás SCP.

A los **Logroñeses**: Chio, Miriam, Laura, Vanesa, Sheila y Dany, gracias por su compañerismo, su hospitalidad y amistad, durante mi estancia en España.

## DEDICATORIAS

Este trabajo, lo dedico con mucho cariño, a mi **FAMILIA**:

Elia, Lito, Sandy, Laura y Uriel, porque cada paso que doy están conmigo ayudándome. Por su amor, paciencia y consejos.

También, dedico esta tesis a mis **abuelos**:

Manuel López García †, Atlagracia López Gaimas † y Teresa Bahena Gómez †.

En especial al abuelo Alfredo Vázquez Figueroa, por su amor incondicional, por su bondad, humor y por las lecciones de vida. Porque no existen mejores historias que las que me has contado, **Compa**.

“Las ideas son como las estrellas, no llegarás a tocarlas con las manos, pero como el marinero en el desierto de las aguas, las eliges como guía y si las sigues alcanzarás tu destino”, Carl Schurz.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	x
ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
I. INTRODUCCION .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
1. Características microbiológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.1 Mecanismos de patogénesis .....	4
2. Mastitis por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
3. Resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA) .....	12
3.1.1. Casete cromosomal estafilocócico <i>mec</i> (SCC <i>mec</i> ) .....	13
3.1.2. Regulación del gen <i>mecA</i> .....	16
4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de adquisición hospitalaria (HA-MRSA) .....	19
5. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de adquisición comunitaria (CA-MRSA) .....	21
6. Infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina en los animales .....	24
6.1 Animales de compañía .....	24
6.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ganado (LA-MRSA) .....	25

<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	31
<b>VII. LÍMITE DE TIEMPO Y ESPACIO</b> .....	40
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	41
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	84
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>XI. LITERATURA CITADA</b> .....	92
<b>VII. ANEXOS</b> .....	109
<b>ANEXO 1. MÉTODO DE 0.5 MCFARLAND</b> .....	109
<b>ANEXO 2. PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCION DE ADN</b> .....	110
<b>ANEXO 3. PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR</b> .....	111

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Factores de virulencia producidos por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
<b>Cuadro 2.</b> Mutaciones detectadas en el gen <i>mecl</i> en cepas MRSA de origen humano.....	19
<b>Cuadro 3.</b> Diferencias entre CA-MRSA y HA-MRSA.....	23
<b>Cuadro 4.</b> Distribución del número de muestras recolectadas en cada municipio.....	32
<b>Cuadro 5.</b> Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR y tamaños de los productos esperados.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Número y porcentaje de aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> por municipio.....	41
<b>Cuadro 7.</b> Sensibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>S. aureus</i> a diferentes antibióticos.....	42
<b>Cuadro 8.</b> Identificación de los genes reguladores en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. A:</b> $\beta$ -Hemólisis en gelosa sangre; <b>B:</b> fermentación del manitol.....	4
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de resistencia a la metilina por <i>S. aureus</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Clases del complejo <i>mec</i> identificados en <i>S. aureus</i> .....	14
<b>Figura 4.</b> Organización genética de los tipos de <i>SCCmec</i> .....	15
<b>Figura 5.</b> Regulación del <i>mecA</i> por <i>mecR1-mecI</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> Prevalencia de HA-MRSA a nivel mundial.....	21
<b>Figura 7.</b> Identificación bacteriológica de <i>S. aureus</i> por métodos microbiológicos y bioquímicos.....	33
<b>Figura 8.</b> PCR del gen <i>mecA</i> y <i>femB</i> de <i>S. aureus</i> .....	44
<b>Figura 9.</b> PCR del gen <i>blaZ</i> en aislamientos de <i>S. aureus</i> .....	45
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa al 2% de los amplicones de PCR de los genes, <i>mecR1</i> y <i>mecI</i> . .....	46
<b>Figura 11.</b> Análisis de las secuencias del gen <i>mecI</i> .....	47

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Patrón de multiresistencia de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> a los antibióticos probados.....	43
---	----

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>BORSA</b>	Borderline oxacillin resistant <i>S. aureus</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CA-MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de adquisición comunitaria
<b>CC</b>	Complejo Clonal
<b>CDC</b>	Centers for Diseases Control and Prevention (Centro de Control y Prevención de Enfermedades)
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>FOX</b>	Cefoxitina
<b>G</b>	Guanina
<b>HA-MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de adquisición hospitalaria
<b>kb</b>	Kilo bases
<b>LA-MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ganado
<b>PVL</b>	Panton-Valentine Leukocidin (Leucocidina de Panton –Valentine)
<b>M</b>	Molar

<b>MH</b>	Mueller-Hinton (medio de cultivo)
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>MSA</b>	Mannitol Salt Agar (medio de cultivo)
<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
<b>ORF</b>	open reading frame (marco de lectura abierto)
<b>OXA</b>	Oxacilina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBP</b>	Penicillin Binding Protein (proteína de unión a la penicilina)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PEN</b>	Penicilina
<b>SCC<sub>mec</sub></b>	Casete Cromosómico Estafilocócico del gen <i>mecA</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos
<b>SCP</b>	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivos
<b>T</b>	Timina
<b>TSST</b>	Toxina del Síndrome de Shock Tóxico

## RESUMEN

### VARIACIÓN GENÉTICA DEL ANTIBIOTIPO METICILINA RESISTENTE DE AISLAMIENTOS de *Staphylococcus aureus* DE ORIGEN BOVINO EN EL VALLE DE TOLUCA

López-Vázquez, Margarita; Velázquez-Ordoñez, Valente; Talavera-Rojas Martín; Martínez-Castañeda, J. Simón.

El *Staphylococcus aureus*, es uno de los principales patógenos, identificados en la mastitis bovina. El tratamiento de esta enfermedad, se realiza principalmente con antibióticos  $\beta$ -lactámicos; sin embargo, se han reportado aislamientos de *S. aureus* resistentes a este tipo de antibióticos. En la actualidad, existe gran preocupación por la presencia de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) en vacas lecheras, debido a que suponen un problema terapéutico, esto implica resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y multiresistencia. El objetivo del estudio fue identificar los genotipos del gen *mecA* relacionados con la presencia de los genes reguladores *mecR1* y *mecI* en *S. aureus*. Para esta investigación, se estudiaron 85 aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas de unidades de producción lechera familiar, en los municipios de Tenango del Valle, Temoaya, Toluca y Zinacantepec, del valle de Toluca. Los aislamientos de *S. aureus* se caracterizaron por pruebas bacteriológicas y fueron confirmados por PCR del gen *femB*. La resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue caracterizada por pruebas de sensibilidad *in vitro* y por PCR de los genes *blaZ* y *mecA*. Asimismo, se analizaron los genes *mecR1* y *mecI*, y se secuenció el *mecI* para la determinar posibles mutaciones. Los resultados mostraron mayor resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a eritromicina entre los *S. aureus*; del total de los aislamientos, 38 (44,7%) fueron positivos al gen *blaZ*. Se detectaron cuatro aislamientos MRSA. En la detección de los genes *mecR1* y *mecI*, el aislamiento MRSA CA-25 y la cepa ATCC 43300 fueron positivos a *mecR1* y *mecI* (grupo A); los aislamientos MRSA CA-15 y MRSA CA-113, no presentaron el gen *mecI* y ni el dominio PB del gen *mecR1* (grupo C); el aislamiento MRSA CA- 20 no portó ningún gen

regulador (grupo D). Las secuencias del gen *mecI* analizadas de MRSA CA-25 y ATCC 43300, no mostraron ninguna mutación y coincidieron con las secuencias de la cepa de referencia N315 pre-MRSA. En conclusión, se identificó la presencia de MRSA en unidades de producción lechera familiar en el Estado de México, además, se caracterizaron los diferentes genotipos de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI*. La importancia de detección de este tipo de cepas en vacas lecheras, radica en la posibilidad de transmisión de MRSA de origen animal al hombre. Este estudio constituye el primer informe en México que caracteriza los diferentes genotipos de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI*, en unidades de producción lechera familiar.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, resistencia a metilina, gen *mecA*, genes reguladores, vacas lecheras.

## ABSTRACT

### METHICILLIN RESISTANT ANTIBIOTYPE GENETIC VARIATION IN *Staphylococcus aureus* ISOLATIONS FROM BOVINES IN TOLUCA VALLEY

López-Vázquez, Margarita; Velázquez-Ordoñez, Valente; Talavera-Rojas Martín; Martínez-Castañeda, J. Simón.

In Mexico, *S. aureus* is one of the main pathogens identified in bovine mastitis. The treatment is usually  $\beta$ -lactamic antibiotics. Nevertheless, there has been reported *S. aureus* resistant strains to it. Nowadays there is great concern regarding MRSA strains (methicillin resistant *S. aureus*) in milking cows, because they are supposed to be treated, with the possibility of  $\beta$ -lactamic antibiotic multiresistance. The objective of the study was to identify the *mecA* gene genotypes related to the presence of *mecR1* and *mecl* regulator genes in *S. aureus*. 85 *S. aureus* isolations were obtained from milking cows from Tenango del Valle, Temoaya, Toluca and Zinacantepec municipalities in Toluca Valley. *S. aureus* were bacteriologically identified and confirmed by gene *femB*.  $\beta$ -lactamic resistance to antibiotics was characterized by *in vitro* sensibility tests and PCR of genes *blaZ* y *mecA*. Genes *mecR1* and *mecl* were analysed and *mecl* was sequenced to determine possible mutations. Results showed higher resistance to  $\beta$ -lactamic antibiotics and erythromycin in *S. aureus* isolations. From all of them, 38 (44,7%) were positive to *blaZ* gene. Four positive isolations were positive to *mecA* and identified as MRSA. In *meR1* and *mecl* genes detection, MRSA CA-25 and ATCC 43300 strains were positive to both genes, *mecR1* and *mecl* (group A). MRSA CA-15 and MRSA CA-113, had no *mecl* gene, neither did the PB command for gene *mecR1* (group C); MRSA CA- 20 had no regulator gene (group D). Sequences for *mecl* genes from MRSA CA-25 and ATCC 43300, showed no mutations and coincided with reference strain N315 pre-MRSA (GenBank Access number X63598.1). MRSA isolations were identified in milking family units in the State of Mexico, as well as different genotypes for genes *mecA*, *mecR1* y *mecl*. The importance of the

detection of these type of strains involves the possibility of MRSA transmission from animals to man, due to milk product contamination o by direct contact with carrier animals. This is the first notification in Mexico regarding the different genotype characterization of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes in milking family production farms.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, *mecA* gene, regulator genes, milking cows.

## I. INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) forma parte de la microbiota normal del hombre y de los animales, además es un patógeno oportunista (Hiramatsu *et al.*, 2004). Posee factores de virulencia que determinan su potencial para colonizar, invadir y diseminarse en el hospedero; dichos factores son en parte, los responsables del amplio espectro de manifestaciones clínicas que causa (Morell y Balkin 2010; Jiménez y Correa, 2009).

Asimismo, se encuentra entre los principales patógenos implicados en infecciones en el hombre a nivel mundial, afectando piel, tejido subcutáneo y sistema respiratorio y en casos severos causa endocarditis, osteomielitis, neumonía y sepsis (Lowy, 1998). En los animales causa enfermedades graves tales como mastitis, artritis, dermatitis exudativa, abscesos subcutáneos, osteomielitis y septicemias (Hermans *et al.*, 2004).

Con respecto al ganado bovino, se encuentra entre los principales agentes causales de mastitis, donde el tratamiento de esta enfermedad se utiliza principalmente los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Esto ha originado la aparición de *S. aureus* resistente a las penicilinas, el mecanismo de dicha resistencia se debe a la producción de  $\beta$ -lactamasas las cuales hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos (Lowy, 2003).

Debido al uso indiscriminado de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el tratamiento de la mastitis, se han aislado *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en vacas lecheras (Gentilini *et al.*, 2008). En los últimos años, el MRSA se ha detectado en varios países como Corea, Hungría, México, Turquía, Bélgica, EUA, entre otros, donde la detección de este tipo de aislamientos en los animales juega un papel importante en la epidemiología de la infección y el contacto con animales portadores representa un riesgo para la salud pública (Kaszanyitzky *et al.*, 2007; Lee, 2003; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008; Turutoglu *et al.*, 2009; Vandendriessche *et al.*, 2013, Haran *et al.*, 2011).

La resistencia a la meticilina es codificada por el gen *mecA*, lo que resulta en la producción de PBP2a, una proteína de unión de penicilina (PBP) que muestra una baja afinidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Chambers, 1997). La PBP2a continua sintetizando

el peptidoglicano mientras que las PBPs habituales son inhibidas por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Berger-Bachi y Rohrer, 2002). La transferencia de esta resistencia es de forma horizontal por medio del casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (Katayama *et al.*, 2000).

La transcripción del gen *mecA* es regulada por los genes *mecI* y *mecR1*, los cuales codifican una proteína represora y una transductora de señal respectivamente (Hiramatsu *et al.*, 2002). Se han realizado algunos estudios sobre la distribución de los genes reguladores en aislamientos de *S. aureus* de origen humano, donde se observaron mutaciones y deleciones en el gen *mecI* (Kobayashi *et al.*, 1998; Petinaki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1993; Weller 1999), en contraste solo existe un reporte donde detectan mutaciones en el gen *mecI* en los animales (Lee, 2006).

En México, se han llevado a cabo pocos estudios orientados a identificar aislamientos MRSA obtenidos de leche de vacas en unidades de producción lechera familiar, sin embargo, no se han caracterizado los diferentes genotipos de los genes reguladores *mecR1* y *mecI*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Características microbiológicas de *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es una bacteria potencialmente patógena de gran importancia en medicina humana y veterinaria causando un amplio espectro de enfermedades. Se estima que cerca del 20% de la población humana es portadora persistente de *S. aureus*, mientras que el 30% es portadora de forma intermitente y el 50% no es colonizada (Wertheim *et al.*, 2005).

Las especies del género *Staphylococcus*, se clasifican en coagulasa positiva (SCP) y coagulasa negativas (SCN), éstas últimas también se encuentran presentes en mucosas y en la piel. El *S. aureus* es la especie de SCP más frecuente y de mayor importancia debido a su papel como patógeno oportunista (Hermans *et al.*, 2004).

*S. aureus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, microscópicamente aparecen en forma de racimos, con un diámetro variado de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , no produce esporas o flagelos. El color amarillo clásico de las colonias de *S. aureus* se debe a la producción de carotenoides; sin embargo, se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas (Velázquez, 2005; Kanafani y Fowler, 2006).

Del mismo modo, produce  $\beta$ -hemólisis en medios con sangre, fermenta el manitol (Figura 1), crece bien en altas concentraciones de NaCl, es catalasa, DNAsa y coagulasa positivo, lo que permite diferenciarlo del resto de especies del género *Staphylococcus* (Bustos *et al.*, 2006).

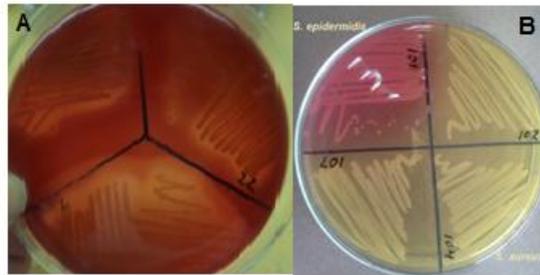


Figura 1. A:β-hemólisis en gelosa sangre; B: Fermentación del manitol

## 1.1 Mecanismos de patogénesis

El *S. aureus* causa en el hombre lesiones superficiales del tejido cutáneo y subcutáneo; dentro de éstas se incluyen foliculitis, forúnculos, celulitis, abscesos e impétigo, y también puede causar infecciones invasivas como neumonía, osteomielitis, miocarditis, meningitis y artritis (Stapleton y Taylor, 2002). De igual forma produce varios tipos de toxicosis, como intoxicación alimentaria, necrólisis epidérmica tóxica y síndrome del choque tóxico (Bustos *et al.*, 2006).

Además, es un patógeno de mayor importancia en medicina veterinaria, debido a que afecta a diversas especies de animales como al ganado bovino, aves de corral, pequeños rumiantes, conejos, cerdos, caballos, entre otras. En estos animales ocasiona diversas alteraciones clínicas entre las que destacan mastitis, artritis, dermatitis exudativa, abscesos subcutáneos, osteomielitis y septicemias (Velázquez *et al.*, 2005; Hermans *et al.*, 2004).

El éxito de la colonización y la producción estas enfermedades por *S. aureus* se debe a la expresión de factores de virulencia, que favorecen la invasión celular, la evasión de la respuesta inmune del hospedero, la multiplicación de la bacteria e intervienen en la aparición de los síntomas de los diferentes cuadros clínicos (Gordon y Lowy, 2008).

Estos factores de virulencia se clasifican en tres categorías: a) involucrados en la adherencia a la célula o matriz extracelular, proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; b) factores involucrados en la evasión de las defensas del hospedero, como las enterotoxinas estafilocócicas (SEs), la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares tipos 1, 5 y 8; c) factores involucrados en la invasión de la célula y penetración de los tejidos,  $\alpha$  toxina,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  hemolisinas (Bustos *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 2005). (Cuadro 1).

Con relación a las toxinas producidas por *S. aureus* se han clasificado en tres grupos: hemolisinas, leucocidinas y toxinas pirogénicas superantígeno (PTSAg) (Grumann *et al.*, 2013).

#### **A. Hemolisina $\alpha$ y $\beta$**

El 95% de *S. aureus* producen hemolisina  $\alpha$  ( $\alpha$  toxina), formadora de poros y con actividad pro-inflamatoria. Causa lisis en células epiteliales, eritrocitos, fibroblastos, monocitos, macrófagos y linfocitos (Grumann *et al.*, 2013). Además, inhibe la actividad de fagocitosis en los neutrófilos de vacas lecheras (Velázquez *et al.*, 2008)

La hemolisina  $\beta$ , es una esfingomielinasa, la cual daña las membranas ricas de este lípido. La toxina  $\beta$  es también conocida como la toxina caliente-fría, debido a su actividad en placas de agar de sangre de oveja. A 37°C, la toxina interactúa con los glóbulos rojos de oveja pero no se lisan, si las placas de agar son incubadas a 4°C, las células se lisan, lo que se observa como una hemólisis en placas (Huseby *et al.*, 2007). Esta toxina se ha identificado en el 72% de los *S. aureus* aislados de mastitis bovina, así como también en el 11% de los aislamientos nasales de humanos sanos y en el 13% de humanos con septicemia (Aarestrup *et al.*, 1999).

**Cuadro 1.** Factores de virulencia producidos por *Staphylococcus aureus*

<b>Componentes estructurales</b>	<b>Función</b>
Peptidoglicano	Presenta actividad endotóxica, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes.
Ácidos teicoicos	Medían la unión de los <i>Staphylococcus</i> a las superficies mucosas.
Proteína A	Activa el complemento y bloquea la fracción Fc de las inmunoglobulinas por lo que previene la fagocitosis e inhibe la opsonización.
Polisacáridos capsulares	Facilita la adherencia bacteriana e inhibe la fagocitosis

<b>Enzimas</b>	<b>Función</b>
Catalasa	Degrada el peróxido de hidrógeno protegiendo al organismo durante la fagocitosis.
Coagulasa	Formación de coágulos, convierte el fibrinógeno en fibrina, facilitando procesos sépticos y la formación de abscesos.
Hialuronidasa	Degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo facilitando la propagación de la infección.

---

Fuente: Chambers y DeLeo, (2009); Gordon y Lowy, (2008); Sibbald *et al.*, (2006).

## **B. Leucocidinas**

Las leucocidinas relacionadas con infecciones humanas son: Leucocidina de Pantón-Valentine (Pantón-Valentine leukocidin, PVL), y hemolisina (HlgACB), Leucotoxina ED (LukED) y Leucotoxina AB/GH (LukAB / GH) (Yoong y Torres, 2013).

### **a. Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV)**

Sólo una minoría (2-3%) de *S. aureus* la producen, se caracteriza por provocar destrucción leucocitaria y necrosis tisular. Su presencia se asocia a infecciones por *S. aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA), y con infecciones de piel y partes blandas y neumonías necrotizantes con una mortalidad elevada (Lina *et al.*, 1999).

### **b. y hemolisina**

Se encuentra en el 99% de los *S. aureus* (von Eiff *et al.*, 2004) y es la única leucotoxina que causa lisis a los eritrocitos, por lo que promueve la supervivencia de *S. aureus* en sangre. Además se ha demostrado en modelo de ratones que se asocia a bacteriemia y artritis séptica (Nilsson *et al.*, 1999).

## **C. Toxinas pirogénicas superantígeno (PTSAg)**

Este grupo engloba tres tipos de toxinas: exfoliatinas, enterotoxinas y la toxina 1 del síndrome del choque tóxico.

### **a. Exfoliatinas**

Se conocen tres tipos de exfoliatinas, ETA, ETB y ETD, codificadas por los genes *eta*, *etb* y *etd*, respectivamente. El gen *eta* se localiza en el genoma mientras que *etb* se encuentra en un plásmido y *etd* en una isla genómica. El cuadro clínico relacionado con este tipo de toxinas es la epidermolisis (Grumann *et al.*, 2013).

### **b. Enterotoxinas**

Producen intoxicación por alimentos contaminados, debido a su estabilidad en condiciones desnaturalizantes, tales como el calor y pH bajo, y no se destruyen completamente por cocción o por digestión. Causan náuseas, vómitos, dolor abdominal, calambres y diarrea. La enfermedad es generalmente autolimitante (Thomas *et al.*, 2007).

En este grupo están incluidas las enterotoxinas (SEs) A, B, C, D, E, G, H, I, R y T, además las enterotoxinas-*like* estafilococicas J, K, L, M, N, O, P, Q, S, U, V y X, las cuales originalmente no inducen emesis. Se ha demostrado que el 80% de *S. aureus* poseen de 5 a 6 genes de PTSAg (Xu y McCormick, 2012).

c. Toxina 1 del síndrome del choque tóxico

Suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial. La toxina actúa como superantígeno estimulando la liberación de varias citocinas, prostaglandinas y leucotrienos. Es responsable del síndrome del choque tóxico caracterizado por fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea y mialgias (Xu y McCormick, 2012).

## **2. Mastitis por *Staphylococcus aureus***

En el Valle de Toluca prevalece el sistema de producción lechera de tipo familiar, el cual favorece el empleo familiar y el desarrollo regional (Bernal *et al.*, 2007). Estas unidades de producción, se caracterizan por la explotación del ganado en pequeñas superficies de terreno, por un manejo no tecnificado, generalmente con ordeño manual; las instalaciones son rústicas y la producción se realiza con escasas medidas de sanidad (Méndez y Cazarín *et al.*, 2000), lo que favorece a malas condiciones de manejo e higiene del ordeño contribuyendo al desarrollo de la mastitis por *S. aureus*, enfermedad de gran importancia sanitaria y económica en la producción lechera (Manjarrez *et al.*, 2012).

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a un daño local que puede ser de origen infeccioso, traumático o tóxico. Se considera como una enfermedad compleja y es producto de la interacción de varios factores resumidos en el animal, el medio ambiente y los microorganismos, jugando el hombre un papel decisivo (Soca *et al.*, 2005).

La mastitis daña considerablemente la salud de la glándula mamaria y la calidad sanitaria de la leche, afectando negativamente la economía del hato, así como también, representa un riesgo potencial a la salud pública por la posible contaminación de la leche y sus productos, por residuos de antibióticos y por la presencia de patógenos causales (Pellegrino *et al.*, 2011). Entre los agentes infecciosos de la mastitis, *S. aureus*, es considerado el principal agente etiológico (Zadoks *et al.*, 2011).

El *S. aureus* coloniza la glándula mamaria a través del pezón, de lesiones de la piel y alcanza el sistema de ductos y alvéolos, lo que ocasiona una respuesta inflamatoria aguda o crónica que afecta la composición físico-química de la leche y la capacidad de producción de la glándula (Velázquez *et al.*, 2005). El principal reservorio de la infección es la ubre afectada (Keefe, 2012); la infección se transmite a través de la máquina de ordeño, de las manos del ordeñador y toallas de papel usadas para secar la ubre (Zadoks *et al.*, 2011).

La mastitis por *S. aureus* se presenta con un cuadro agudo severo al inicio de la lactación, en tanto que a finales del segundo o tercer tercio de lactación el cuadro puede mostrarse con características de inflamación aguda o crónica (Ávila y Gutiérrez, 2010). Igualmente el *S. aureus* es la causa más frecuente de mastitis gangrenosa, además puede producir mastitis crónica la cual se caracteriza por la fibrosis de la glándula mamaria, así como, atrofia e induración de los cuartos afectados (Velázquez *et al.*, 2005).

Si bien existen métodos para prevenir y controlar la mastitis bovina, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de infecciones, aun cuando esta práctica conlleve a la selección de aislamientos resistentes que interfieren de manera negativa en el tratamiento (Wolter *et al.*, 2004).

En este contexto diversos estudios han reportado aislamientos de *S. aureus* aislados de leche de vaca resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas macrólidos, donde se destaca que el mayor porcentaje de resistencia es para los  $\beta$ -lactámicos (Gentilini *et al.*, 2000; de Oliveira *et al.*, 2000).

En los últimos años, la problemática de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por *S. aureus* se ha ampliado debido muchas veces a la carencia de una política reguladora del uso de los antibióticos con fines terapéuticos en medicina veterinaria. Este hecho puede favorecer la transferencia horizontal de cepas multiresistentes de animales al hombre, dejando en claro que el uso inapropiado de antibióticos constituye un riesgo emergente para la salud pública (Pellegrino *et al.*, 2011; Oliver y Murinda, 2012).

### **3. Resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos por *Staphylococcus aureus***

La pared celular del *S. aureus* está constituida por una malla de glicano (polisacárido) y cadenas interconectadas por enlaces cruzados peptídicos conocidos como peptidoglicano. La síntesis del peptidoglicano se lleva a cabo por enzimas unidas a la membrana conocidas como proteínas de unión a la penicilina (penicillin binding proteins, PBPs) (Llarrull *et al.*, 2009).

Las PBPs actúan como enzimas catalíticas produciendo una estructura reticulada de peptidoglicano, dando como resultado una pared celular estable (Hiramatsu *et al.*, 2002). Estas proteínas biosintéticas pueden catalizar la actividad glicosiltransferasa (para la

elongación de la hebra glicano) y la actividad transpeptidasa (para la interconexión de la hebra glicano por enlaces cruzados peptídicos) (Llarrull *et al.*, 2009).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son análogos estructurales de residuos de D-alanil-D-alanina y se unen de forma covalente a la D-alanil-D-alanina de las PBPs, inhibiendo su función transpeptidasa (Hiramatsu *et al.*, 2002) y como consecuencia se ve afectada la pared celular, produciendo lisis de la bacteria (Fluit *et al.*, 2001).

En la década de los 40 aparecieron infecciones causadas por *S. aureus* con resistencia a la penicilina, estas cepas producían una enzima llamada  $\beta$ -lactamasa, la cual hidroliza el núcleo  $\beta$ -lactámico esencial para la actividad antimicrobiana (Chambers y DeLeo, 2009).

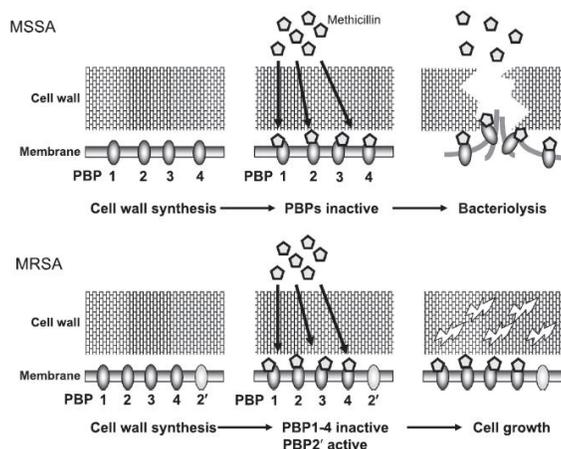
El gen *blaZ* es el causal de la producción de estas  $\beta$ -lactamasas que pueden transmitirse vía plásmidos. La expresión de la  $\beta$ -lactamasa por el gen *blaZ* es inducida por la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, a través de los genes reguladores *blaI* y *blaR1*, los cuales codifican una proteína represora y una proteína transdutora de señal respectivamente (Plata *et al.*, 2009).

Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican de acuerdo a sus preferencias del sustrato y sus características de inhibición. Cuatro grupos son incluidos en esta clasificación, la  $\beta$ -lactamasa tipo 1, ataca a las cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico; la  $\beta$ -lactamasa tipo 2, actúa sobre las penicilinas y cefalosporinas, los subgrupos de estas enzimas se conocen como 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e y 2f, los cuales se definen en base al índice de hidrólisis de carbenicilina, cloxacilina, ceftazidime de amplio espectro, cefotaxime o aztreonam y la inhibición de clavulanato respectivamente. Las  $\beta$ -lactamasas de tipo 3, afectan solamente penicilinas naturales; la de tipo 4, se le atribuye el ataque a las penicilinas que son relativamente resistentes a las demás  $\beta$ -lactamasas (Wax *et al.*, 2008).

### 3.1 *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA)

La metilicina fue introducida en Europa en 1959 y un año después se detectó la primera cepa de *S. aureus* metilicina resistente ("methicillin resistant *S. aureus*", MRSA) (Bustos *et al.*, 2006). Esta resistencia fue denominada intrínseca, ya que no se debía a la destrucción del antibiótico por la  $\beta$ -lactamasa (Vasquez *et al.*, 2008).

Durante la década de los 70, el MRSA emergió como un serio problema en EUA causando problemas esporádicos en hospitales y por 1990 las cepas MRSA se convirtieron en la principal infección nosocomial por todo el mundo (Leonard y Markey, 2008). El *S. aureus* resistente a la metilicina se caracteriza por la producción de una proteína de unión a la penicilina (PBP2a) de 78 kDa, codificada por el gen *mecA* (Chambers, 1997). La PBP2a es una transpeptidasa que se caracteriza por presentar baja afinidad a los  $\beta$ -lactámicos y por continuar la síntesis del peptidoglicano, manteniendo la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división celular, cuando las enzimas habituales son inhibidas por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Gil, 2000) (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo de resistencia a la metilicina por *S. aureus*. En *S. aureus* metilicina sensibles (MSSA) todas las PBPs son inactivadas por los  $\beta$ -lactámicos, en cambio en MRSA la PBP2a sigue sintetizando la pared celular por su baja afinidad a estos antibióticos (Kawada y Komatsuzawa, 2012).

### 3.1.1. Casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*)

El gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* ("staphylococcal cassette chromosome *mec*", SCC*mec*), el cual se transfiere de forma horizontal (Katayama *et al.*, 2000).

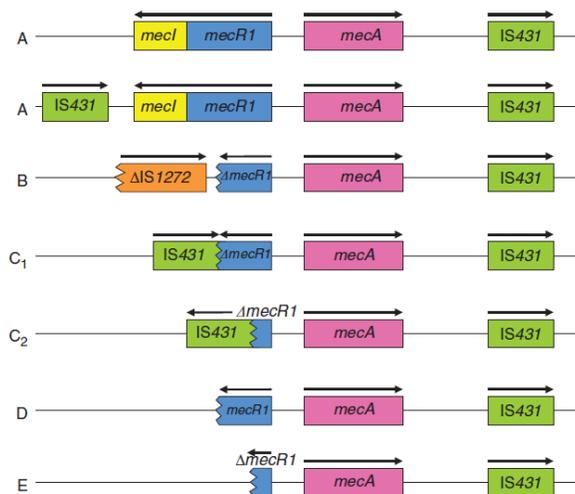
El SCC*mec* es un fragmento de ADN con un tamaño entre 21 a 67 kb, dependiendo el tipo de SCC*mec* (Hiramatsu *et al.*, 2001), se inserta al final del extremo 3' de un marco de lectura abierto ("open reading frame", ORF), denominado *orfX*, en un sitio único (*attB<sub>sc</sub>*), cerca del origen de replicación de *S. aureus* (Hiramatsu *et al.*, 2002; Lindsay, 2010).

El SCC*mec* tiene tres componentes genéticos esenciales: el complejo del gen *mec* (el gen *mecA*, genes reguladores y secuencias de inserción *IS431* y *IS1272*), el complejo del gen *ccr* (*ccrA* y *ccrB*) y una región conocida como J (junkyard). La estructura y secuencias de nucleótidos de estos complejos se utiliza para definir el tipo de SCC*mec* (Bustos *et al.*, 2006; Hiramatsu *et al.*, 2002).

El complejo *mec* de aproximadamente de 30 a 50 kb, se encuentran en *S. aureus* resistente a la meticilina (Chambers, 1997). El complejo *mec* contiene el elemento de inserción *IS431*, que ha sido frecuentemente asociado con genes que codifican resistencia a diversos antibióticos y al mercurio (Hiramatsu *et al.*, 2002), así como también el transposon Tn554 que contiene el gen *ermA* que codifica la resistencia a la eritromicina (Chambers, 1997).

Con base en su estructura se han identificado cinco clases de complejo *mec* (A-E) (Hiramatsu *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2007). Los diferentes complejos *mec* son clasificados de la siguiente manera: **Clase A**, *mecI-mecR1-mecA-IS431*; **clase B**, *IS1272-ΔmecR1-mecA-IS431* (el dominio de unión a la penicilina (PB) del *mecR1* es reemplazado por *IS1272*); **clase C1** y **C2**, *IS431-ΔmecR1-mecA-IS431*; **clase D**, *ΔmecR1-mecA-IS431*

(delección de PB de *mecR1*); **clase E**,  $\Delta$ *mecR1*–*mecA*–*IS431* (delección del dominio MS de *mecR1*) (Merethe y Ericson, 2006) (Figura 3).

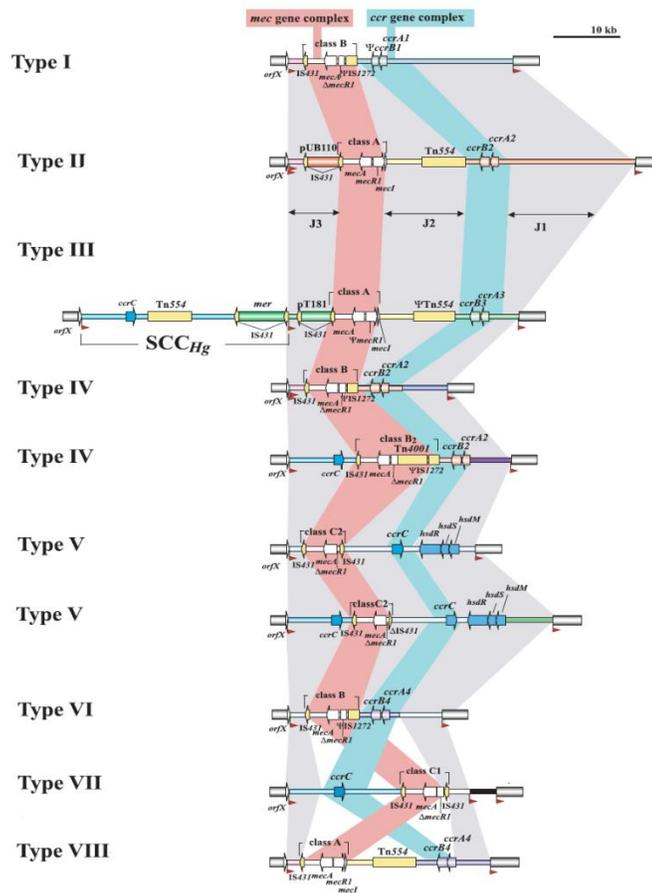


**Figura 3:** Clases del complejo *mec* identificados en *S. aureus*. Fuente (Merethe y Ericson, 2006).

El complejo *ccr* está compuesto por genes que codifican para recombinasas responsables de la movilización del *SCCmec*; ellas median su integración y escisión del cromosoma. Se han reportado cinco tipos de *ccr*, cuatro de ellos son alotipos denominados del 1 al 4, que comparten aproximadamente el 80% de la identidad y presentan los genes *ccrA* y *ccrB*; el quinto tipo, denominado *ccr5* o *ccrC*, presenta el gen *ccrC*, no está relacionado con los genes *ccrA* y *ccrB* (Jiménez y Correa, 2009).

La región J comprende tres fragmentos denominados J1, J2 y J3; puede contener plásmidos o transposones portadores de genes de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos y a metales pesados. El fragmento J1 se localiza entre el complejo *ccr* y el extremo cromosómico flanqueante derecho; el J2, entre los complejos *ccr* y *mec*, y el J3, entre el complejo *mec* y el *orfX* (Jiménez y Correa, 2009; Kondo *et al.*, 2007).

Se han descrito hasta la fecha 11 tipos de SCCmec (I-XI), los cuales se han definido por la combinación de las clases de *ccr* y *mec*. El SCCmec tipo I (34.3 kb), se diseminó entre las cepas MRSA aisladas en los años 60, durante los primeros años de la quimioterapia, sólo contiene la resistencia a los antibióticos que confiere *mecA* (Ito *et al.*, 2004) (Figura 4).



**Figura 4.** Organización genética de los tipos de SCCmec. Fuente: IWG-SCC, (2009).

En cambio los SCCmec tipos II (53.0 kb) y III (66.9 kb), presentes en cepas dominantes en los años 80, contienen múltiples genes de resistencia a diferentes antibióticos, el transposón Tn554 codifica la resistencia a eritromicina, el  $\psi$ Tn554 la

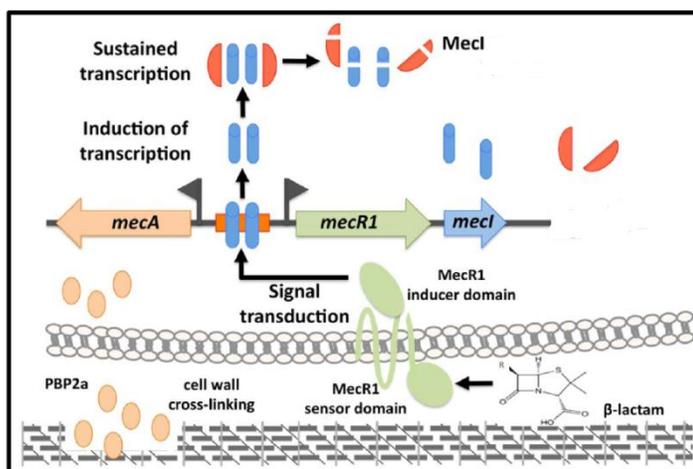
resistencia a cadmio, la secuencia de inserción IS431 facilita la adquisición de resistencia a los antibióticos y la resistencia al mercurio, el plásmido pUB110 codifica la resistencia a tobramicina/ bleomicina y el pT181 codifica la resistencia a tetraciclina. (Hiramatsu *et al.*, 2001).

Tanto el SCCmec tipo IV (20.9-24.3 kb) como el tipo V (28 kb) son elementos pequeños, ya que les falta el fragmento donde se encuentran los transposones y plásmidos, por lo tanto, no portan resistencia a otros antibióticos diferentes a los  $\beta$ -lactámicos. Al igual que el tipo I, pero a diferencia del tipo II, los tipos IV y V son altamente transmisibles (Ito *et al.*, 2004; Deurenberg y Stobberingh, 2008).

### 3.1.2. Regulación del gen *mecA*

El gen *mecA* es regulado por el gen represor *mecI*, mientras el gen *mecR1* es el encargado de transmitir la señal de detección de  $\beta$ -lactámicos (Gil, 2000), estos genes reguladores (Camarena y Sánchez, 2003).

El gen *mecI* codifica una proteína represora de la transcripción: MecI. El gen *mecR1* codifica una proteína de transducción de señal: MecR1. Las proteínas MecI y MecR1 regulan la transcripción inducible del *mecA* de la siguiente manera. MecR1 registra la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos con su dominio extracelular de unión a la penicilina (PB) y activa su dominio citoplásmico (MS) en forma de proteasa, por rompimiento autocatalítico. Esta proteasa rompe la proteína represora MecI que se encuentra unida al sitio operador del gen *mecA*, liberando la represión de la transcripción, por lo que se lleva a cabo la expresión del gen *mecA* produciéndose la proteína PBP2a (Hiramatsu *et al.*, 2001) (Figura 5).



**Figura 5.** Regulación del gen *mecA* por *mecR1-mecI*. En presencia de un antibiótico β-lactámico, MecR1 se activa y rápidamente induce la expresión del gen *mecA* y *mecR1* y *mecI*. Fuente: Berger-Bächli y Rohrer, (2002).

Además, los genes reguladores de las β-lactamasas, *blaI* y *blaR1*, co-regulan la expresión del gen *mecA* debido a que son estructural y funcionalmente similares (Chambers, 1997). Respecto a esta similitud las proteínas Mecl y Blal se pueden unir como homodímeros a la región promotor/operador, tanto de *mecA* y *blaZ*. La represión de la transcripción por estos dos inhibidores es aún más fuerte cuando ambos están presentes (Ender *et al.*, 2008).

Otros factores involucrados en la expresión de la resistencia a la meticilina son los factores *fem* (factor esencial para la resistencia a la meticilina) o *aux* (auxiliar), los cuales comprenden seis tipos de genes: *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* y *femF*, estos factores están presentes en aislamientos sensibles y resistentes de *S. aureus*. La mutación de estos genes altera la composición del peptidoglicano. El *femA* y *femB* codifican 2 proteínas citoplasmáticas que se requieren para la formación del puente de pentaglicina interpeptídica, que sirve de enlace cruzado del peptidoglicano. La interrupción de estos

genes reduce el nivel de resistencia de *S. aureus* a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Berger-Bächi y Rohrer, 2002; Kobayashi *et al.*, 1994).

Por otro lado, las cepas MRSA que contienen los genes *mecl* y *mecR1* intactos han sido definidas como pre-MRSA, donde el *mecl* reprime fuertemente la expresión de la PBP2a y por lo tanto, el pre-MRSA es fenotípicamente sensible (Suzuki *et al.*, 1993). La inducción de la transcripción del gen *mecA* es muy lenta, y la mutación del gen represor es un requisito previo para expresión de la resistencia a la meticilina (Hiramatsu *et al.*, 2002).

Aunque el gen *mecA* está presente en todos los MRSA, existe una considerable variación en la presencia de otros genes involucrados en la expresión de la resistencia a la meticilina. Estudios previos han detectado *mecR1-mecl* en 60-95% de los *S. aureus* *mecA* positivos (Suzuki *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1996). Se ha concluido que los MRSA que expresan fenotípicamente la resistencia no poseen el gen *mecl* o está mutado, lo que evita la represión de la transcripción del gen *mecA* (Kobayashi *et al.*, 1998).

En los últimos años, se han realizado estudios sobre la distribución de los genes reguladores en aislamientos de MRSA de origen humano, donde se observaron mutaciones y deleciones en el gen *mecl*, supresiones tanto en *mecl* y *mecR1* y mutaciones en el promotor *mecA*/región operadora (Kobayashi *et al.*, 1998; Petinaki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1993; Weller, 1999).

El siguiente cuadro presenta las mutaciones descritas en el gen *mecl* por Kobayashi *et al.*, (1998) y Lee (2006).

**Cuadro 2.** Mutaciones detectadas en el gen *mecl* en cepas MRSA de origen humano.

Mutación en el gen <i>mecl</i>		
No.	Cambio de posición de nucleótido	Cambio de codón
1	43(G→T)	Val15 →Phe
2	163 (A→T)	Lys 55 →codón de stop
3	202(C→T)	Gln 68 →codón de stop
4	Delección de 28 bases (28-55 o 29-56)	Codón de stop después del 11 aminoácido
5	Adición de C en la posición 23*	

---

\*Identificada en *S. aureus* aislado de pollos, descrita por Lee, (2006).

En este contexto, Suzuki *et al.*, (1993), estudiaron con detalle la diversidad genética de los genes reguladores, los cuales distinguieron 4 grupos diferentes: en el grupo A, las cepas contienen completamente la región reguladora incluyendo el gen *mecl*, el cual presenta mutación; el grupo B, el gen *mecl* esta deletado; grupo C los aislamientos tienen delección del gen *mecl* y la región 3' (dominio PB) del gen *mecR1* y por último en el grupo D, los MRSA no presentan ningún gen regulador.

#### **4. *Staphylococcus aureus* resistente a metilina de adquisición hospitalaria (HA-MRSA)**

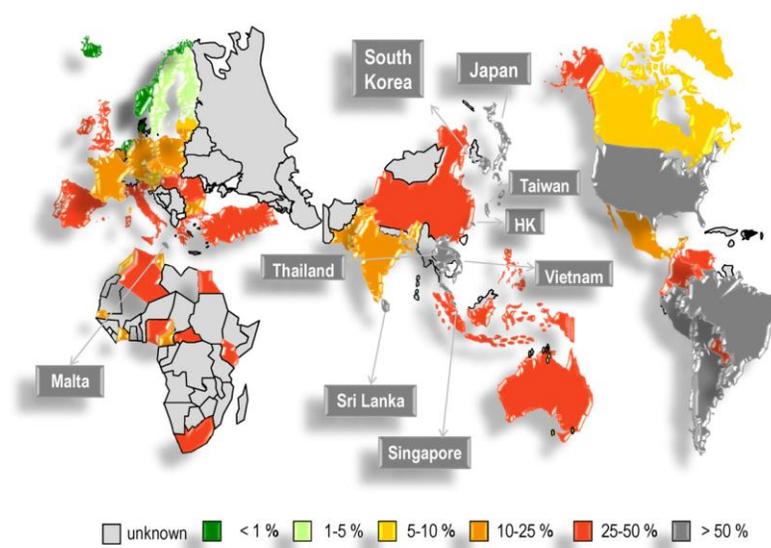
La importancia de MRSA radica en que son los principales agentes causales de brotes hospitalarios, en particular en unidades de quemados o quirúrgicas, donde la

presencia de heridas profundas y dispositivos médicos tales como catéteres proporcionan entornos propicios para su crecimiento (Shinefield y Ruff, 2009).

En este caso la principal vía de transmisión es por contacto directo, por lo general, por las manos o guantes de los trabajadores de los hospitales, de igual forma los fómites y portadores nasales juegan un papel importante en dicha transmisión. Los pacientes infectados contaminan fácilmente el entorno y los MRSA pueden sobrevivir durante semanas en los tejidos y superficies. Existen informes donde se confirma que los trabajadores, principalmente las enfermeras son portadores de cepas epidémicas y no epidémicas de *Staphylococcus* (Lin *et al.*, 2007).

Asimismo, entre los factores que incrementan la probabilidad de adquirir este tipo de infección incluyen: hospitalización prolongada, procedimientos quirúrgicos, presencia de catéteres o prótesis, diálisis y la permanencia en lugares de alto riesgo: unidades de cuidados intensivos, sala de neonatos y unidades quirúrgicas, entre otras (Velázquez, 2005; Benoit *et al.*, 2008).

La importancia de estas cepas, se relaciona con su elevada prevalencia en los hospitales en todo el mundo. Aunque los datos epidemiológicos a menudo no son comparables debido a las diferencias en el diseño del estudio y al tamaño de la muestra, las tasas más altas de MRSA (> 50%) se registran en el Norte y Sur de América, entre los países que destacan son Estados Unidos, Brasil, Chile, así como también, Asia y Malta. Tasas intermedias (25-50%) son reportadas en México, Venezuela, Túnez, India, China, Australia, África y algunos países de Europa como Portugal (49%), Grecia (40%), Italia (37%) y Rumanía (34%). Prevalencias bajas (5-10%) se han observado en los Países Bajos, Canadá y Arabia Saudita (Mejía *et al.*, 2010; Stefani *et al.*, 2012) (Figura 6).



**Figura 6.** Prevalencia de HA-MRSA a nivel mundial. Fuente Stefani *et al.*, (2012).

En general, se estima que el MRSA causa 171 200 infecciones nosocomiales en Europa cada año, lo que corresponde al 44% del total de las infecciones hospitalarias. También se estima que causa 5 400 muertes y más de un millón de días adicionales de hospitalización asociados con estas infecciones (ECDC/EMEA, 2009).

La evolución de las cepas MRSA ha dado origen a clonas pandémicas, identificándose cinco tipos: Ibérica, Pediátrica, Húngara, Nueva York/Japón y Brasileña, provocando una alarma epidemiológica a nivel mundial por su diseminación y su corta acción terapéutica en contra de ellas (Velázquez, 2005).

### **5. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de adquisición comunitaria (CA-MRSA)**

En los años 90, se describieron en Australia brotes por MRSA en grupos de personas sin los factores clásicos de HA-MRSA, empezándose a reconocer como infecciones de MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA) para diferenciarlo de aquellos adquiridas en el hospital (García, 2011).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EUA (CDC por sus siglas en inglés), define que la infección por CA-MRSA ocurre en aquellas personas que no tienen un historial clínico de infección, sin antecedentes de hospitalización o asilo en una casa de reposo en el último año, además de no contar con un historial médico en el último año de: hospitalización, cirugía, diálisis, catéteres permanentes o dispositivos médicos (Millar *et al.*, 2007).

El CA-MRSA se relaciona comúnmente con infecciones de piel y tejidos blandos, estas infecciones suelen manifestarse como celulitis, forúnculos y abscesos; algunos casos pueden ser severos y estar asociados a neumonía necrotizante, empiema, sepsis, bacteremia, osteomielitis, fascitis necrotizante y púrpura fulminans; en cuyo caso se asocian a altas tasas de morbilidad y mortalidad (Benoit *et al.*, 2008).

Las cepas CA-MRSA y las HA-MRSA difieren no solamente en su cuadro clínico y en su epidemiología, sino que presentan en general características fenotípicas y genotípicas distintas. Los CA-MRSA típicamente poseen la toxina Leucocidina Pantón-Valentine (PVL), pero algunos clones no la contienen (Zhang *et al.*, 2008). Además, el CA-MRSA se caracteriza por causar brotes en comunidades cerradas, que afectan a grupos familiares, militares, reclusos, niños en guarderías y deportistas (Kennedy y DeLeo, 2009) (Cuadro 3).

El primer reporte descrito de CA-MRSA en México, fue en un hospital de Nuevo León en el año 2011, otros casos se han reportado en países de Sudamérica, Uruguay, Argentina, Paraguay, Chile, Ecuador, Colombia, Venezuela y Brasil (Velázquez *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2005; García 2011).

**Cuadro 3.** Diferencias entre CA-MRSA y HA-MRSA

	CA-MRSA	HA-MRSA
<b>SCCmec</b>	IV, V, VI	I, II, III
<b>Presencia del gen <i>pvl</i></b>	>95%	<5%
<b>Susceptibilidad a antibióticos</b>	Resistentes a los antibióticos $\beta$ -lactámicos y en menor medida a otras familias de antibióticos	A menudo multiresistentes
<b>Población afectada</b>	Niños y jóvenes; atletas y deportistas; personal militar; reclusos; drogadictos	Ancianos, personas debilitadas y/o con infecciones crónicas
<b>Factores de riesgo</b>	Estar en lugares con estrecho contacto, lesiones en piel, falta de higiene.	Inmunodeprimidos, cirugía, catéteres, hospitalización previa
<b>Transmisión</b>	Propagación de persona a persona. Instalaciones compartidas (por ejemplo, equipos de deporte, toallas, piscinas). Propagación del medio ambiente a la persona.	Propagación de persona a persona (entre enfermeras, médicos, cirujanos, visitantes, pacientes). Propagación del medio ambiente al paciente.
<b>Cuadro clínico</b>	Infecciones de piel y tejidos blandos (celulitis, forúnculos y abscesos); en casos severos causan neumonía necrotizante, sepsis, bacteremia, osteomielitis, fascitis necrotizante.	Cuadros clínicos graves. A menudo bacteriemia sin foco de infección obvio; úlceras abiertas, heridas quirúrgicas, catéteres urinarios.

Fuente: Millar *et al.*, (2007).

En la actualidad se está produciendo un rápido aumento en la prevalencia de CA-MRSA en algunos países, principalmente en EUA y a menudo, está sustituyendo a las cepas propiamente hospitalarias, de forma que la barrera entre ambos tipos es cada vez menor. Esto se refleja en que cepas consideradas CA-MRSA en ocasiones están presentando resistencias a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos no propias de estos clones (Deresinski *et al.*, 2005). Además, recientemente están surgiendo infecciones en la comunidad producidas por clones cuyo origen parece estar relacionado con animales de producción (Wulf y Voss, 2008).

Sólo unas pocas clonas de CA-MRSA se han diseminado a través del mundo. Se han identificado dos clonas principales, la USA300 y la USA400. La clona USA300 se ha localizado en jugadores de fútbol y presos, mientras que la cepa USA400 se ha encontrado en varias poblaciones étnicas (Bustos *et al.*, 2006).

## **6. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en los animales**

### **6.1 Animales de compañía**

*S. aureus* causa un amplio rango de infecciones oportunistas en animales de compañía, como infecciones superficiales de piel, infecciones post-operatorias y, en ocasiones es el causante de importantes patologías (Cuny *et al.*, 2010).

El primer reporte de infección de MRSA en animales de compañía fue en gatos (Lilenbaum *et al.*, 1998). Desde entonces se han aislado en numerosos casos y en diferentes países, (Pinto *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), donde la frecuencia de aislamiento en gatos y perros es <10% (Leonard y Markey, 2008).

De igual manera, se ha detectado MRSA en hospitales de equinos en Japón, EUA, Reino Unido, Australia, Alemania e Irlanda, relacionándose con infecciones de piel y tejidos blandos; artritis séptica, bacteremia, osteomielitis, e infecciones de implantes (Van den Eede *et al.*, 2009; Leonard y Markey, 2008). En estos casos la transmisión de la infección se da por contacto con el personal veterinario, además el ambiente contaminado del hospital es una fuente importante de infección (Weese *et al.*, 2005). Incluso se ha aislado cepas MRSA en animales exóticos como en tortuga, loro y murciélago (Walther *et al.*, 2008).

Algunos estudios han mostrado que la mayoría de las cepas MRSA obtenidas de animales de compañía, muestran características similares a las aisladas en los humanos (Strommenger *et al.*, 2006). Por lo tanto, no se descarta el posible origen humano de estas cepas, siendo el hombre el que probablemente extienda estos clones en hospitales, en la comunidad y a los propios animales de compañía (Walther *et al.*, 2009; Weese *et al.*, 2005).

Por el contrario, los animales portadores constituyen un reservorio de cepas MRSA, pudiendo transferir dichos microorganismos al ser humano, aumentando así la capacidad de diseminación y consecuentemente de infección (Walther *et al.*, 2009).

## **6.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado al ganado (LA-MRSA)**

Dada la importancia de *S. aureus* como agente causal de mastitis bovina y el uso generalizado de los antibióticos intramamarios en esta especie, no es sorprendente que los primeros aislamientos de MRSA en los animales se encontraran en la leche de vacas (Lee, 2003). El MRSA se ha aislado también en otros animales de producción como cerdos (Voss *et al.*, 2005), y en menor medida en pollos (Lee, 2003;), ovejas y conejos (Leonard y Markey, 2006).

El primer caso de transmisión directa de MRSA entre el hombre y vacas con mastitis subclínica fue documentado por Kaszanyitzky *et al.*, (2007). La detección de MRSA en los animales desempeña un papel importante en la epidemiología ya que éstos representan un reservorio natural y el contacto con animales portadores implica un riesgo para la salud humana (Lee, 2003; Voss *et al.*, 2005; Weese *et al.*, 2005).

Asimismo el riesgo potencial de adquirir la infección por MRSA, se da por exposición ocupacional en granjas de cerdos y ganado bovino (Huijsdens *et al.*, 2006; Graveland *et al.*, 2011b), este hecho también se ha documentado en las personas que trabajan con caballos y perros (Lewis *et al.*, 2008; van Loo *et al.*, 2007).

Relacionado a lo anterior se ha reportado que los granjeros y sus familiares, trabajadores de rastros y veterinarios presentan un mayor riesgo de colonización y de infección por MRSA, asociado con la intensidad de contacto y al número de animales positivos (Wulf *et al.*, 2008; Sakwinska *et al.*, 2011). Con respecto a este tema, Voss *et al.* (2005), describieron que los criadores de cerdos holandeses tienen 760 veces mayor riesgo de ser colonizados por MRSA en comparación con la población holandesa.

En un estudio longitudinal, se demostró que la prevalencia de MRSA disminuye rápidamente durante la ausencia del contacto con los animales, durante vacaciones y entre los ciclos de producción (Graveland *et al.*, 2011b), observándose que la higiene de la granja (limpieza y desinfección del establo) y el uso adecuado de los antibióticos se asocia a una baja prevalencia de MRSA en los animales (Graveland *et al.*, 2011a).

Actualmente, se ha descubierto en Dinamarca, Francia, Canadá y en los Países Bajos, que la cepa MRSA CC398 (complejo clonal) de origen animal se encuentra en la población humana (Lewis *et al.*, 2008). Vanderhaeghen *et al.*, (2010) realizaron una investigación en Bélgica, donde detectaron una elevada prevalencia de cepas MRSA aisladas de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica. Todos estos aislamientos

pertenecieron al CC398, el cual causa problemas en el tratamiento de las infecciones debido a que presenta multirresistencia.

La infección por *S. aureus* en el hombre y en el ganado presenta un desafío epidemiológico mundial para los problemas de salud humana y animal. El incremento de la prevalencia de MRSA implica un serio problema terapéutico en el ambiente hospitalario; del mismo modo, *S. aureus* es uno de los principales agentes causales de mastitis bovina entre el ganado vacuno lechero (Brody *et al.*, 2008; Gil, 2000).

### III. JUSTIFICACIÓN

En el valle de Toluca, prevalece el sistema de producción lechera de tipo familiar, el cual favorece el empleo familiar y el desarrollo regional. En este tipo de sistema, las condiciones de higiene y el manejo sanitario son deficientes, lo cual contribuye al desarrollo de la mastitis, entre los agentes infecciosos de esta enfermedad, el *S. aureus*, es considerado como el principal agente etiológico.

En la actualidad, la infección por *S. aureus* en los hatos lecheros, se asocia a un nivel elevado de resistencia a los antibióticos, particularmente a los  $\beta$ -lactámicos, este hecho constituye una alerta epidemiológica, debido a la emergencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA).

Se ha observado que las personas que tienen contacto directo con animales positivos a MRSA tienen un alto riesgo de ser portadores de la infección, además se ha documentado casos de transmisión entre los miembros de la familia, lo que evidencia la importancia del estudio de este tipo de aislamientos en el ganado bovino lechero.

En México, se han realizado pocas investigaciones orientadas a identificar *S. aureus* resistente a la meticilina de origen bovino, además no se han analizado los genes *mecR1* y *mecI*, dicho análisis de los genes reguladores podría explicar las bases moleculares sobre la diversidad genética y la resistencia a la meticilina de *S. aureus* en medicina veterinaria. Es por ello, que el presente estudio estuvo orientado a detectar aislamientos de MRSA en vacas, de unidades de producción lechera familiar y determinar su variación genética con relación a la detección de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), obtenidos de bovinos en unidades de producción lechera familiar, muestran diferentes genotipos del gen *mecA* y los genes reguladores, *mecR1* y *mecI*.

## V. OBJETIVOS

### General:

Detectar los diferentes genotipos del gen *mecA* relacionados con la presencia de los genes reguladores *mecR1* y *mecI* en aislamientos de *S. aureus*, de vacas de unidades de producción lechera familiar en el valle de Toluca.

### Específicos:

- Identificar los aislamientos de *S. aureus* en muestras de leche de vaca por pruebas fenotípicas bacteriológicas y por PCR mediante la detección del gen *femB*.
- Determinar la sensibilidad *in vitro* de *S. aureus* a diferentes antibióticos y la presencia del gen *blaZ*.
- Identificar por PCR el gen *mecA* en aislamientos de *S. aureus*.
- Detectar por PCR los genes *mecR1* y *mecI* en aislamientos MRSA y clasificarlos de acuerdo a su ausencia o presencia.
- Detectar mutaciones en el gen *mecI* por secuenciación.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

En el presente estudio, se emplearon 85 aislamientos de *S. aureus* obtenidos de un estudio previo, aislados de leche de vacas en el valle de Toluca (López *et al.*, 2011). Las muestras de leche se adquirieron a partir de un muestreo estratificado en cuatro municipios del valle de Toluca: Temoaya, Tenango del Valle, Toluca y Zinacantepec. El tamaño de la muestra se obtuvo con base a la población de vacas lecheras existentes en cada municipio (INEGI, 2007) y con una prevalencia del 25% de *S. aureus* reportada por estudios previos (García y Tapia, 2006), además, se empleó la siguiente formula:

Donde:

n = tamaño mínimo de la muestra

L= número de estratos (4)

Z= nivel de confianza (95%= 1.96)

$p_i$  = probabilidad de que el evento ocurra en el estrato  $i$  (25% = 0.25)

$q_i = 1 - p_i$  (1- 0.25= 0.75)

B = error estimado (5% = 0.05)

$N_i$  = población de cada estrato

W= peso asignado al  $i$ ésimo estrato

Tamaño de muestra mínimo: n 276.

$$n = \frac{\sum_{i=1}^L \frac{N_i^2 p_i q_i}{w_i}}{\frac{N^2 B^2}{z^2} + \sum_{i=1}^L N_i p_i q_i}$$

El muestreo se realizó en 27 unidades de producción lechera familiar, cuyos productores estuvieron de acuerdo al muestreo. Estas unidades se caracterizaron por la aplicación de manejo de ordeño manual y el empleo de mano de obra familiar. Las muestras se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito por National Mastitis

Council, (1999). Se recolectaron 302 muestras de leche bajo condiciones asépticas, de las vacas en línea de ordeño en diferentes etapas de lactación y número de parto (cuadro 4).

Del total de muestras de leche, se obtuvieron 85 aislamientos *S. aureus* los cuales fueron conservados en caldo infusión cerebro corazón adicionado con 25% de glicerol v/v, a una temperatura de -80°C.

**Cuadro 4.** Distribución del número de muestras recolectadas en cada municipio.

Municipios	No. (%) de unidades de producción	No. (%) de muestras
Temoaya	7(26.0)	57 (18.9)
Tenango del valle	8(29.6)	81(26.8)
Toluca	8(29.6)	75 (24.8)
Zinacantepec	4(14.8)	89 (29.5)
<b>Total</b>	<b>27(100)</b>	<b>302 (100)</b>

---

## IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS de *Staphylococcus aureus*.

Los aislamientos se inocularon en placas de agar base de gelosa sangre (BD Bioxon, México) y agar sal y manitol (BD Bioxon, México), y se incubaron a 37°C durante 24 h. La identificación de *S. aureus* se basó en la morfología de la colonia; en el agar base de gelosa sangre; las colonias de *S. aureus* presentan color blanco grisáceo o amarillas, tienen forma convexa y la mayoría presentan hemólisis alfa o beta; en el medio agar sal y manitol las colonias son de color amarillo debido a la fermentación del manitol (Bautista-Trujillo *et al.*, 2013).

Se seleccionó una sola colonia del medio agar sal y manitol y se sometió a las pruebas de coagulasa, catalasa, fermentación anaerobia del manitol y tinción de Gram (Wichelhaus *et al.*, 1999). Como control positivo para *S. aureus* se empleó la cepa ATCC 25923 y como negativo, la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 (Figura 7).



**Figura 7.** Identificación bacteriológica de *S. aureus* por métodos microbiológicos y bioquímicos.

## **CARACTERIZACIÓN DEL ANTIBIOTIPO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)**

### **Sensibilidad *in vitro* de *S. aureus* a los antibióticos.**

La sensibilidad *in vitro* a diferentes antibióticos se llevó a cabo por el método de difusión en disco, siguiendo el procedimiento establecido por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), empleándose los siguientes antibióticos: Penicilina (10U), Ampicilina (10µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg), Eritromicina (15µg), Trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75µg), Cefalotina (30µg), Cefuroxima (30µg), Cefotaxima (30µg), Ceftazidima (30µg). Para la detección de *S. aureus* resistente a la meticilina, se emplearon los unidiscos de oxacilina (1µg), cefoxitina (30µg) y amoxicilina/ácido clavulánico (20/10µg) para caracterizar la resistencia a la meticilina (CLSI, 2012).

El inóculo se preparó empleando el método de suspensión directa de colonias en caldo Mueller-Hinton, se comparó la turbidez del crecimiento bacteriano establecida por el método de McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) (Anexo 1). Para inocular el agar Mueller-Hinton se utilizó un hisopo estéril de algodón, el cual se humedeció con la suspensión y se distribuyó uniformemente en toda la superficie del medio, se dejaron secar 10 min y posteriormente se depositaron los discos correspondientes.

El diámetro de las zonas de inhibición se determinaron después de 24 horas de incubación a 35°C, y fueron comparadas con los valores establecidos por CLSI, (2012), para determinar el fenotipo de resistencia, intermedio y sensibilidad a los antibióticos para el género *Staphylococcus spp.* Como controles de la prueba se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y ATCC 43300.

Para la detección del antibiotipo MRSA a partir de *S. aureus* resistente a la oxacilina, se realizó la prueba de tamizado de oxacilina (oxacillin agar screen), en la cual, de cada

aislamiento se hizo una suspensión directa de colonias en caldo Mueller-Hinton, con una suspensión bacteriana a una densidad de 0,5 McFarland. De cada cultivo se inoculó por duplicado en placas de agar Mueller-Hinton adicionadas con 4% de NaCl y 6µg/mL de oxacilina y se incubaron por 24 horas a 35 °C. Para esta prueba se consideraron como MRSA aquellos aislamientos que resistieron esta concentración. La cepa ATCC 29213 (sensible) y cepa ATCC 43300 (resistente), se emplearon como controles positivos.

## **DETECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE MRSA, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

### **Extracción de ADN bacteriano**

La extracción de ADN nuclear se llevó a cabo utilizando el kit comercial, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EUA) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2).

### **Cuantificación del ADN**

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro y programa informático de cuantificación NANO-DROP. La pureza del ADN se obtiene por la relación entre la absorbancia de 260nm y 280nm. La preparación pura del ADN presenta un cociente entre 1.8 y 2.0.

### **Detección de los genes *femB* y *mecA* por PCR multiplex**

El total de los aislamientos de *S. aureus*, fueron probados para la identificación de MRSA, el cual se llevó a cabo mediante la detección del gen *femB* (específico de *Staphylococcus aureus*) y el gen *mecA* (codificante de la resistencia a meticilina) (Kobayashi *et al.*, 1994), los iniciadores utilizados se encuentran descritos en el cuadro 5. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5min; desnaturalización 94°C por 1min; alineación a 55°C por 1min;

extensión a 72°C por 2min y extensión final a 72°C por 7 min, por 30 ciclos. Como control positivo se empleó la cepa ATCC 43300.

### **Detección del gen *blaZ***

La detección del gen *blaZ*, que confiere resistencia del *S. aureus* a la penicilina, se realizó de acuerdo a Schnellmann *et al.*, (2006), las secuencias de los iniciadores empleados y los tamaños de los amplicones se indican en el cuadro 5. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3min; desnaturalización a 94°C por 1min; alineación a 50°C por 1min; extensión a 72°C por 1min y extensión final a 72°C por 5min, por 30 ciclos.

### **Detección de los genes *mecR1* y *mecl*.**

Los aislamientos positivos al gen *mecA* fueron estudiados para los genes reguladores *mecR1* y *mecl*. Para esto, se utilizaron los iniciadores *mecR1A* para el dominio citoplásmico (MS) y el *mecR1B* para el dominio de unión a la penicilina (PB) del gen *mecR1* (Kobayashi *et al.*, 1996) (Cuadro 5). Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 43300 y como control negativo agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5min; desnaturalización a 97°C por 1min; alineación a 57°C por 1min; extensión a 72°C por 2min y extensión final a 72°C por 7min, por 30 ciclos.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25µL. La mezcla de reacción consistió en 100ng de ADN, 200 µM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), 10µM de los iniciadores excepto para los iniciadores *femB* 13µM, 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EUA), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y Buffer 10X.

**Cuadro 5.** Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR y tamaños de los productos esperados

Gen	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
<i>mecA</i>	Sentido: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC Antisentido: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	Kobayashi <i>et al.</i> , (1994)
<i>femB</i>	Sentido: TTACAGAGTAACTGTTACC Antisentido: ATACAAATCCAGCACGCTCT	651	
<i>blaZ</i>	Sentido: CAGTTCACATGCCAAAGAG Antisentido: TCACTCTTGGCGGTTTC	772	Schnellmann <i>et al.</i> , (2006)
<i>mecR1A</i> (dominio MS)	Sentido: GTCTCCACGTTAATTCCATT Antisentido: GTCGTTCAATTAAGATATGACG	310	
<i>mecR1B</i> (dominio PB)	Sentido: AAGCACCGTTACTATCTGCACA Antisentido: GAGTAAATTTTGGTCGAATGCC	236	Kobayashi <i>et al.</i> , (1996)
<i>mecl</i>	Sentido: AATGGCGAAAAAGCACAACA Antisentido: GACTTGATTGTTTCCTCTGTT	481	

### Visualización de los amplicones

Todos los productos de amplificación de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (SIGMA-Aldrich, EUA). Además de ser comparados utilizando los marcadores de peso molecular, GeneRuler™ Low Range DNA Ladder 25 a 700 pb (Fermentas, EUA) para los genes *femB*, *mecA*,

*mecR1* y *mecI* y GeneRuler™ 50pb DNA Ladder 50 a 1000 pb (Fermentas, EUA) para el gen *blaZ*. Después de realizar la electroforesis a 96 V por 70 min, los geles se visualizaron en UV y se capturaron en un sistema de foto documentación (minBIS Pro, Bio Imaging Systems).

## Clasificación de los genes reguladores

Los aislamientos de MRSA se agruparon de acuerdo a la presencia y ausencia de sus genes reguladores en: **grupo A**, los aislamientos contienen los genes reguladores *mecR1* y *mecI*; **grupo B**, en estos aislamientos solo el gen *mecI* está deletado; **grupo C**, en este grupo el gen *mecI* y el dominio PB del gen *mecR1* están suprimidos y el **grupo D**, en el cual las cepas de *S. aureus* carecen de los genes reguladores (Suzuki *et al.*, 1993).

## Secuenciación del gen *mecI*

Los productos de la PCR positivos al gen *mecI*, fueron purificados utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, México), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3). Posteriormente, estos amplicones purificados fueron secuenciados directamente, utilizando los mismos iniciadores empleados para la amplificación y el producto Big Dye Terminator® v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, EUA). Las secuencias fueron procesadas en un analizador de secuencias 3100 (Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, estos amplicones fueron secuenciados directamente, utilizando los mismos iniciadores para la amplificación y el producto Big Dye Terminator® v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, EUA). Las secuencias fueron procesadas en un analizador de secuencias 3100 (Applied Biosystems, EUA).

La alineación de las secuencias se realizó en el software CLUSTALW2, asimismo las secuencias se compararon con la secuencia de la cepa de *S. aureus* pre-MRSA N315

estudiada por Hiramatsu *et al*, (1992), la cual posee los genes *mecR1* y *mecI* (GenBank no. de acceso X63598.1).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar las diferencias estadísticas en el aislamiento de *S. aureus* y la presencia de los genes de resistencia en los diferentes municipios; los resultados se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrada de Pearson ( $\chi^2$ ), con un nivel  $\alpha$  de 0.05, y un intervalo de confianza del 95%. Con valores menores de 5 se utilizó el método de corrección de Yates (Wayne, 2006).

## **VII. LÍMITE DE TIEMPO Y ESPACIO**

La presente investigación se realizó durante el periodo de agosto de 2011 a julio 2013. Los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo en el área de Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México ubicado en el Km. 15.5 de la carretera Panamericana Toluca - Atlacomulco.

## VIII. RESULTADOS

### Distribución geográfica de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que la frecuencia general de aislamiento de *S. aureus* en hatos lecheros del valle de Toluca, fue del 28.1%. El total de *S. aureus* fue de 85, los municipios estudiados presentaron poblaciones estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al aislamiento positivo.

Asimismo, la distribución municipal del aislamiento de *S. aureus* fue de la siguiente manera; de las muestras obtenidas en el municipio de Temoaya, 29 (34.1%) fueron positivas a *S. aureus*; en Tenango del Valle, 16 (18.9%) fueron positivas; en Toluca, así como, en Zinacantepec, se identificaron 20 (23.5%) aislamientos de *S. aureus*. Como podemos notar en estos resultados, el municipio de Temoaya mostró la mayor número de positividad para *S. aureus* (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Número y porcentaje de aislamiento de *Staphylococcus aureus* por municipio.

Municipios	No. (%) aislamiento de <i>S. aureus</i>
Temoaya	29 (34.1)
Tenango del valle	16 (18.9)
Toluca	20 (23.5)
Zinacantepec	20 (23.5)
<b>Total</b>	<b>85 (100)</b>

---

### Resistencia fenotípica de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

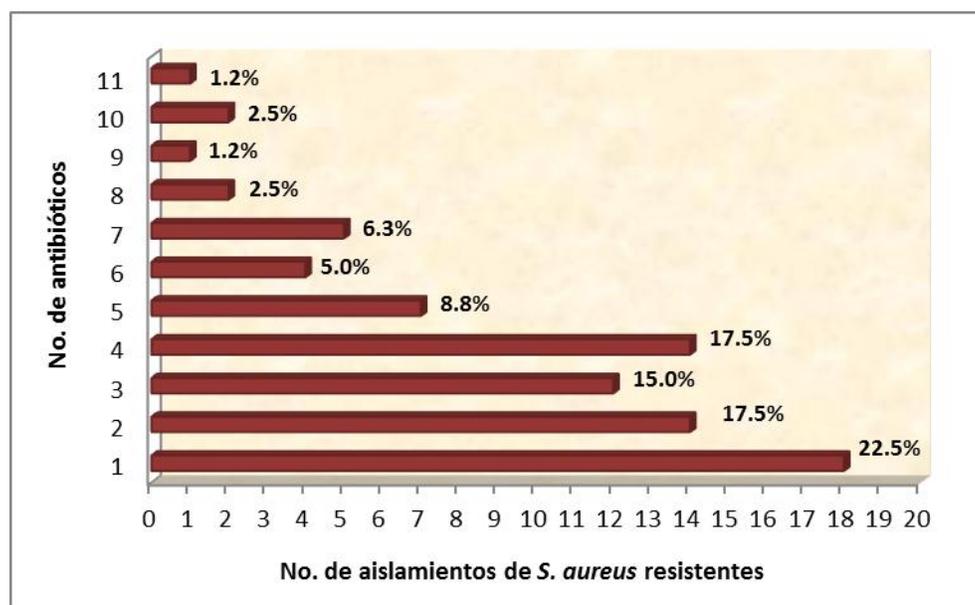
En cuanto al patrón de sensibilidad *in vitro* a los antibióticos, se observó un mayor porcentaje de aislamientos de *S. aureus* con resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El mayor porcentaje de resistencia se presentó frente a ceftazidima con un 91.8% (78/85), seguido por 50.6% (43/85) a ampicilina y 44.7% (38/85) a penicilina y eritromicina. El 20% de los *S. aureus* mostraron resistencia a oxacilina, el 4.7% fueron resistentes a cefoxitina y el 10.6% a amoxicilina/ácido clavulánico. El total de aislamientos estudiados mostraron sensibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol (cuadro 7).

**Cuadro 7.** Sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Staphylococcus aureus* a diferentes antibióticos.

Antibióticos	No. (%) aislamientos sensibles	No. (%) aislamientos intermedios	No. (%) aislamientos resistentes
Penicilina	47 (55.3)	0 (0)	38 (44.7)
Oxacilina	62 (73.0)	6 (7.0)	17 (20.0)
Cefoxitina	81 (95.3)	0 (0)	4 (4.7)
Ampicilina	42 (49.4)	0 (0)	43 (50.6)
Amoxicilina/ácido clavulánico	76 (89.4)	0 (0)	9 (10.6)
Cefotaxima	49 (57.7)	12 (14.1)	24 (28.2)
Ceftazidima	1 (1.2)	6 (7.0)	78 (91.8)
Cefuroxima	73 (85.9)	2 (2.3)	10 (11.8)
Cefalotina	75 (88.2)	4 (4.8)	6 (7.0)
Gentamicina	81 (95.4)	2 (2.3)	2 (2.3)
Eritromicina	26 (30.6)	21 (24.7)	38 (44.7)
Tetraciclina	58 (68.2)	2 (2.3)	25 (29.5)
Trimetoprim- sulfametoxazol	85 (100.0)	0 (0)	0 (0)

Además, 5 aislamientos de *S. aureus* no mostraron resistencia a ningún antibiótico, sin embargo, se observaron diferentes fenotipos de multiresistencia, donde el 17.5% (14/80) de los aislamientos fueron resistentes a 2 o 4 antibióticos, el 15.0% (12/80) exhibieron resistencia a 3 antibióticos y 1.2% (1/80) fue resistente a 11 de los 13 antibióticos probados (gráfica 1).

**Gráfica 1.** Patrón de multiresistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos probados.

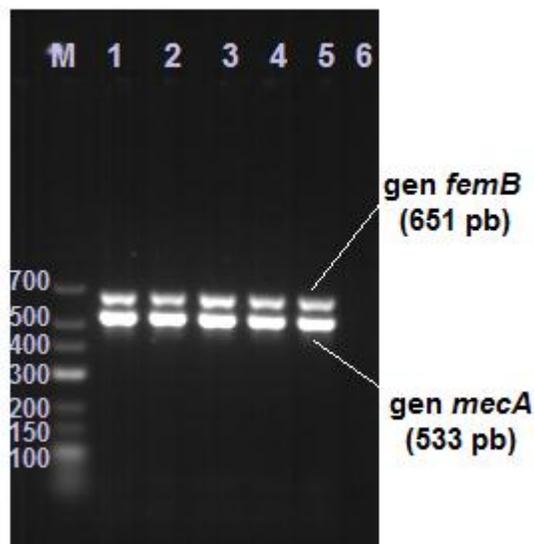


Con respecto a los resultados obtenidos en la prueba de tamizado de oxacilina (*oxacillin agar screen*), se observaron 13 (15.3%) aislamientos de *S. aureus* positivos a dicha prueba, identificándose como *S. aureus* meticilina resistente.

### Identificación de los aislamientos de *S. aureus* resistentes a la meticilina

Se identificaron 85 aislamientos como *S. aureus*, tomando como base las características morfológicas de las colonias y los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas; asimismo, se confirmaron todos al ser positivos al gen *femB* por PCR. De los

85 *S. aureus* solo cuatro (4.7%) portaron el gen *mecA*, relacionados con el genotipo MRSA, los aislamientos restantes se consideraron como *S. aureus* sensibles a metilicina (MSSA) (Figura 8).

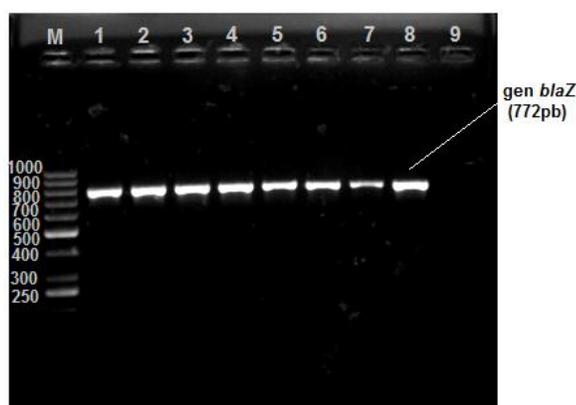


**Figura 8.** PCR del gen *mecA* y *femB* de *S. aureus*. El carril M es el marcador de peso molecular; carril 1 cepa control positiva ATCC 43300; carril 2 aislamiento MRSA 15; carril 3 aislamiento MRSA 113; carril 4 aislamiento MRSA 20; carril 5 aislamiento MRSA 20 y carril 6 control negativo.

En la distribución de los aislamientos de MRSA, provenientes de los municipios del valle de Toluca fue la siguiente: un aislamiento (1.2%), se detectó en el municipio de Temoaya; dos (2.3%) en Toluca y uno (1.2%) en Tenango del Valle. Los municipios estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), en cuanto a la detección de MRSA.

### Determinación del gen *blaZ*

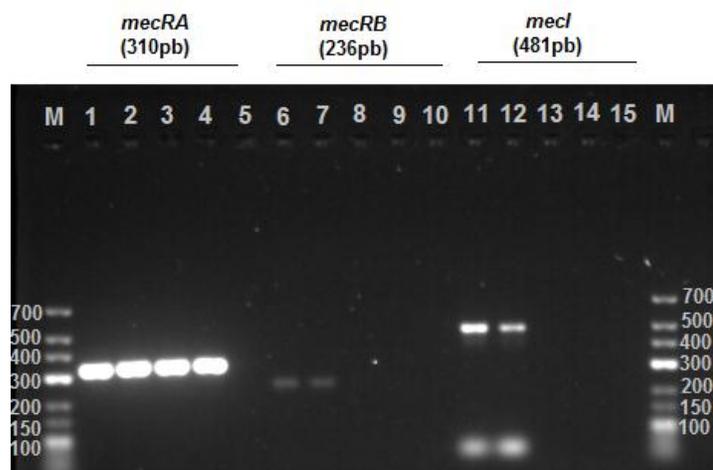
Los 38 (44.7%) aislamientos de *S. aureus* que mostraron resistencia fenotípica a la penicilina, fueron positivos al gen *blaZ* por PCR, asociado a la producción de  $\beta$ -lactamasas (figura 9). La detección del gen *blaZ* no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) en los municipios estudiados.



**Figura 9.** PCR del gen *blaZ* en aislamientos de *S. aureus*. El carril M es el marcador de peso molecular; carril 1 cepa control positiva ATCC 43300; carril 2 aislamiento MRSA 15; carril 3 aislamiento MRSA 113; carril 4 aislamiento MRSA 20; carril 5 aislamiento MRSA 25; carril 6 aislamiento MSSA 16; carril 7 aislamiento MSSA 136; carril 8 aislamiento MSSA 205 y carril 9 control negativo.

### Detección de los genes *mecR1* y *mecI*.

De acuerdo al patrón de detección de los genes reguladores *mecR1* y *mecI*, el aislamiento MRSA CA-25 fue positivo para los genes *mecR1* y *mecI* (grupo A); los aislamientos MRSA C-A15 y MRSA CA-113 fueron positivos al dominio MS del gen *mecR1* (grupo C) y el aislamiento MRSA CA-20 fue negativo a los dos genes reguladores (grupo D) (figura 10 y cuadro 8).



**Figura 10.** Gel de agarosa al 2% de los amplicones de PCR de los genes, *mecR1* y *mecl*. El carril M es el marcador de peso molecular; carril 1, 6 y 11, cepa control MRSA ATCC 43300; carril 2, 7 y 12 aislamiento MRSA 25; carril 3, 8 y 13 aislamiento MRSA 15; carril 4, 9 y 14, aislamiento MRSA 113; carril 5, 10 y 15, aislamiento MRSA 20.

**Cuadro 8.** Identificación de los genes reguladores en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Cepa	Producto de PCR				Clasificación*
	<i>mecA</i>	<i>mecR1A</i> (MS)	<i>mecR1B</i> (PB)	<i>mecl</i>	
ATCC 43300	+	+	+	+	A
MRSA CA-25	+	+	+	+	A
MRSA CA-15	+	+	-	-	C
MRSA CA-113	+	+	-	-	C
MRSA CA-20	+	-	-	-	D

(+)Presencia del gen; (-) ausencia del gen; \*clasificación propuesta por Suzuki *et al.*, (1999).

## Secuenciación del gen *mecl*

Los productos de PCR del aislamiento MRSA CA-25 y la cepa ATCC 43300 positivos al gen *mecl*, se envió a secuenciar para detectar posibles mutaciones presentes en dicho gen. Los resultados obtenidos a través del análisis de las secuencias, mostraron que, las secuencias del gen *mecl*, fueron idénticas que en la cepa N315 pre-MRSA. Como se observa en la figura 11 las secuencias de los aislamientos MRSA estudiados estuvieron altamente conservadas.

```

ATCC43300   ATAATGGATAATAAAACGTATGAAATATCATCTGCAGAATGGGAAGTTATGAATATCATT 60
N315        ATAATGGATAATAAAACGTATGAAATATCATCTGCAGAATGGGAAGTTATGAATATCATT 60
CEPA25      ATAATGGATAATAAAACGTATGAAATATCATCTGCAGAATGGGAAGTTATGAATATCATT 60
.....

ATCC43300   TGGATGAAAAAATATGCAAGTGCGAATAATATAATAGAAGAAATACAAATGCAAAAGGAC 120
N315        TGGATGAAAAAATATGCAAGTGCGAATAATATAATAGAAGAAATACAAATGCAAAAGGAC 120
CEPA25      TGGATGAAAAAATATGCAAGTGCGAATAATATAATAGAAGAAATACAAATGCAAAAGGAC 120
.....

ATCC43300   TGGAGTCCAAAAACCATTTCGTACACTTATAACGAGATTGTATAAAAAGGGATTTATAGAT 180
N315        TGGAGTCCAAAAACCATTTCGTACACTTATAACGAGATTGTATAAAAAGGGATTTATAGAT 180
CEPA25      TGGAGTCCAAAAACCATTTCGTACACTTATAACGAGATTGTATAAAAAGGGATTTATAGAT 180
.....

ATCC43300   CGTAAAAAAGACAATAAAATTTTCAATATTACTCTCTTGTAGAAGAAAGTGATATAAAA 240
N315        CGTAAAAAAGACAATAAAATTTTCAATATTACTCTCTTGTAGAAGAAAGTGATATAAAA 240
CEPA25      CGTAAAAAAGACAATAAAATTTTCAATATTACTCTCTTGTAGAAGAAAGTGATATAAAA 240
.....

ATCC43300   TATAAAACATCTAAAAACTTTATCAATAAAGTATACAAAGGCGGTTTCAATTCACCTTGTC 300
N315        TATAAAACATCTAAAAACTTTATCAATAAAGTATACAAAGGCGGTTTCAATTCACCTTGTC 300
CEPA25      TATAAAACATCTAAAAACTTTATCAATAAAGTATACAAAGGCGGTTTCAATTCACCTTGTC 300
.....

ATCC43300   TTAACCTTTGTAGAAAAAGAAGATCTATCACAAGATGAAATAGAAGAATTGAGAAATATA 360
N315        TTAACCTTTGTAGAAAAAGAAGATCTATCACAAGATGAAATAGAAGAATTGAGAAATATA 360
CEPA25      TTAACCTTTGTAGAAAAAGAAGATCTATCACAAGATGAAATAGAAGAATTGAGAAATATA 360
.....

```

**Figura 11.** Análisis de las secuencias del gen *mecl*. Cepa ATCC 43300 y en el aislamiento de MRSA 25 comparadas con la cepa N315 pre-MRSA (GenBank no. de acceso X63598.1; Hiramatsu *et al*, 1992).

From: **Comité Editor** (archmv@uach.cl)  
Sent: Tuesday, October 29, 2013 5:51:46 PM  
To: josesimonmc@hotmail.com  
Be careful! This sender failed our fraud detection checks.  
Show content

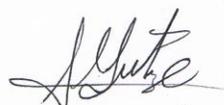
Estimado(a) Dr. Simon Martinez, Margarita López, Martin Talavera, Juan José Valdez, Valente Velázquez:

Gracias por enviarnos su manuscrito "Genotipos de los genes mecA, mecR1 y mecI en aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino en unidades de producción lechera familiar, México" a Archivos de Medicina Veterinaria. A través del sistema de gestión de revistas online, podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:  
<http://www.ramedveterinaria.equipu.cl/index.php/ramedveterinaria/author/submit/659>  
Nombre de usuario/o: simonmc

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactarnos. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Atentamente,  
Claudia Cárdenas A.  
Asistente Editorial  
Archivos de Medicina Veterinaria

No. Bo.  
  
20/nov/13

**Genotipos de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* en aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino en unidades de producción lechera familiar, México**

Genotypes of *mecA* gene and regulatory genes *mecI* and *mecRI* isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine from Family Dairy Farms, Mexico

M López -Vázquez<sup>a</sup>, JS Martínez -Castañeda<sup>a</sup>, M Talavera-Rojas<sup>a</sup>, JJ Valdéz -Alarcón<sup>b</sup>, V Velázquez -Ordoñez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México.

<sup>b</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarímbaro, Michoacán, México.

## SUMMARY

In Mexico, like other countries the *Staphylococcus aureus* is the major pathogen identified in bovine mastitis. The treatments of this disease, utilize mainly  $\beta$ -lactam antibiotics; however, in Mexico exist reports of resistant *Staphylococcus aureus* to this type of antibiotics, however, at present, the molecular mechanisms of MRSA not been extensively studied.

In this work, we studied *S. aureus* isolates from bovine, which were identified by PCR amplification *femB* gene. The resistance of the isolates to  $\beta$ -lactam antibiotics was characterized by antimicrobial susceptibility tests and by PCR of the genes, *blaZ*, and *mecA*; we also included analysis of their regulatory genes *mecI* and *mecR1*. Ours results showed an increased resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics and erythromycin between the *S. aureus*; but, only 38 (44.7%) were positive for *blaZ* gene. In other hand, all the *S. aureus* isolates were tested for *mecA* gene, and only four were positive to this gene, these were grouped of followed form: one was positive for both *mecR1* and *mecI* genes (Group A), two do not showed *mecI* gene and PB domain of *mecR1* gene (group C) and one do not showed both regulatory genes (group D). In conclusion, we have identified the presence of MRSA isolates on family dairy farms in the state of Mexico, and theirs resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics; was analyzing molecularly, indicated, that this, could be regulated by different genotypes of the *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes present in the MRSA isolates.

*Key words:* *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, *mecA* gene, bovine

*Palabras clave:* *Staphylococcus aureus*, resistencia a meticilina, gen *mecA*, bovino

## INTRODUCCIÓN

En México, existen un gran número de unidades de producción lechera familiar, debido a que estas ayudan a la generación de autoempleo en las comunidades rurales. Estas unidades de producción, se caracterizan por la explotación del ganado en pequeñas superficies de terreno, por un manejo no tecnificado, generalmente con ordeño manual; las instalaciones son rusticas y la producción se realiza con escasas medidas de sanidad (Méndez y Cazarín y col 2000), lo que favorece a malas condiciones de manejo e higiene del ordeño, contribuyendo al aumento de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en el hato lechero (Manjarrez y col 2012). Entre los agentes infecciosos de la mastitis, *S. aureus*, es considerado el principal agente etiológico (Zadoks y col 2011). En la actualidad, la infección por *S. aureus* en los hatos lecheros, se asocia a un nivel elevado de resistencia a los antibióticos, particularmente a los  $\beta$ -lactámicos, este hecho constituye una alerta epidemiológica, debido a la emergencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Haran y col 2011).

El MRSA, produce una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), la cual tiene baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Chambers 1997). La PBP2a es codificada por el gen *mecA*, el cual se transfiere de manera horizontal a través del SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) (Katayama y col 2000). Hasta el momento se han descrito once variantes del cassette SCC*mec* en base a la distribución de sus genes, regiones espaciadoras y a la presencia de alelos de los genes de las recombinasas *ccr* (Shore y col 2011). La transcripción del gen *mecA* es regulada por los genes, *mecRI* que codifica una proteína de transducción de señal, (MecR1), y *mecI* que codifica la proteína represora de transcripción, (MecI) (Hiramatsu y col 2002). Además, los genes *blaR1* y *blaI* reguladores del gen *blaZ* participan en la co-regulación de la transcripción del gen *mecA* (Lewis y col 2000). La transcripción del gen *mecA* se produce cuando la proteína MecR1 se expone a la presencia de  $\beta$ -lactámicos con su dominio extracelular de unión a penicilina (PB), activando su dominio citoplásmico (MS) en forma de proteasa; a continuación, se escinde la proteína represora MECI la cual está bloqueando la región operadora del *mecA* y de esta manera es posible la expresión de PBP2a (Zhang y col 2001).

Se han llevado a cabo estudios sobre la identificación de los genes *mecRI* y *mecI* en *S. aureus* de origen humano, (Kobayashi y col 1996, Weller 1999, Petinaki y col 2001), en contraste solo

existe un reporte realizado en animales (Lee, 2006). En relación con los resultados obtenidos por Suzuki y col (1993), los aislamientos MRSA se agruparon de acuerdo a la detección de sus genes reguladores en: grupo A, para aquellos aislamientos que contienen completamente los genes reguladores; grupo B, estos aislados no portan el gen *mecI*; grupo C, en este grupo el gen *mecI* y el dominio PB del gen *mecRI* están suprimidos y por último, el grupo D, los aislamientos carecen de los genes reguladores.

El objetivo de este estudio fue identificar la distribución de aislamientos MRSA en bovinos, de unidades de producción lechera familiar en el Estado de México, además de caracterizar los genotipos de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* e identificar con esto el grupo genético que más prevalece en este tipo de hatos lecheros.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección de la muestra

Se muestrearon 27 unidades de producción lechera familiar ubicadas en cuatro municipios del valle de Toluca, Estado de México: Temoaya, Tenango del Valle, Toluca y Zinacantepec (figura 1). La obtención de las muestras se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito por National Mastitis Council (NMC 1999). Se recolectaron 302 muestras de leche por ordeño manual bajo condiciones asépticas, a partir de un muestreo estratificado de las vacas en línea de ordeño de diferentes etapas de lactación y número de parto. El número de muestras recolectadas en los municipios estudiados se distribuyeron de la siguiente manera: Temoaya 57, Tenango del Valle 81, Toluca 75 y Zinacantepec 89.

### Identificación y caracterización de los aislamientos de *S. aureus*

Para la identificación fenotípica de *S. aureus*, las muestras de leche, se inocularon en placas de agar base de gelosa sangre (BD Bioxon, México) y agar sal y manitol (BD Bioxon, México). Los criterios para la identificación de *S. aureus* se basaron de acuerdo a las características morfológicas de las colonias en los medios de cultivo (Bautista-Trujillo y col 2013). Se seleccionó una sola colonia del medio agar sal y manitol y se sometió a las pruebas de coagulasa, catalasa y tinción de Gram (Wichelhaus y col 1999). Como cepas controles se utilizaron: *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

### Sensibilidad *in vitro* a los antibióticos

La prueba de sensibilidad *in vitro* se llevó a cabo por el método de difusión en disco, de acuerdo al Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2012), se emplearon los siguientes antibióticos (Bio-Rad, México): Penicilina (10U), Ampicilina (10 $\mu$ g), Gentamicina (10 $\mu$ g), Tetraciclina (30 $\mu$ g), Eritromicina (15 $\mu$ g), Trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75 $\mu$ g), Cefalotina (30 $\mu$ g), Cefuroxima (30 $\mu$ g), Cefotaxima (30 $\mu$ g), Ceftazidima (30 $\mu$ g). Así como también se utilizaron discos de oxacilina (1 $\mu$ g), cefoxitina (30 $\mu$ g) y amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 $\mu$ g) para caracterizar la resistencia a la meticilina (CLSI 2012). Se empleó la cepa control *S. aureus* ATCC 25923. Aquellos aislamientos que fueron resistentes a la oxacilina se sometieron a la prueba de oxacillin agar screen, para la detección de MRSA. Este método se realizó siguiendo el procedimiento descrito por CLSI (2012) empleando agar Mueller-Hinton adicionado con 4% de NaCl y 6 $\mu$ g/mL de oxacilina, identificándose como MRSA aquellos que resistieron esta concentración. Como control positivo se utilizó *S. aureus* ATCC 43300.

#### Extracción del ADN de la bacterias

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial, GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Determinación del gen *femB*

La confirmación de *S. aureus* se llevó a cabo por PCR, mediante la detección de un fragmento del gen *femB*, los iniciadores utilizados están descritos en el cuadro 1.

#### Determinación de los genes de resistencia

Los genes que confieren resistencia del *S. aureus* a la penicilina (*blaZ*) y a la meticilina (*mecA*), se realizó de acuerdo a Schnellmann y col (2006) y (Kobayashi y col 1994) respectivamente, los iniciadores utilizados están descritos en el cuadro 1. Los aislamientos positivos al gen *mecA* fueron estudiados para los genes reguladores *mecRI* y *mecI*. Para esto, se utilizaron los iniciadores *mecRIA* para el dominio citoplásmico (MS) y el *mecRIB* para el dominio de unión a la penicilina (PB) del gen *mecRI* (Kobayashi y col 1996). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 $\mu$ L. La mezcla de reacción consistió en 100ng de ADN, 200  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), 10 $\mu$ M de los iniciadores excepto para los iniciadores *femB* 13 $\mu$ M, 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y Buffer 10X; y las condiciones de amplificación fueron específicas para cada par de iniciadores y están indicadas en el cuadro 1.

Todos los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (SIGMA-Aldrich, USA). Además fueron medidos utilizando los marcadores de peso molecular, GeneRuler™ Low Range DNA Ladder 25 a 700 pb (Fermentas, USA) para los genes *femB*, *mecA*, *mecR1* y *mecI*, GeneRuler™ 50pb DNA Ladder 50 a 1000 pb (Fermentas, USA) para el gen *blaZ*. Después de la electroforesis a 96 V por 70 min, los geles se visualizaron y capturaron en un sistema de foto documentación (minBIS Pro, Bio Imaging Systems).

#### Clasificación de los genes reguladores

Los MRSA se agruparon de acuerdo a la ausencia o presencia de sus genes reguladores en: grupo A, grupo B, grupo C y grupo D, de acuerdo a Suzuki y col (1993).

## RESULTADOS

#### Identificación y caracterización de los aislamientos de *S. aureus*

A partir de las 302 muestras obtenidas, se identificaron 85 aislamientos como *S. aureus*, tomando como base las características morfológicas de las colonias y los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, asimismo se confirmaron al ser todos positivos al gen *femB* por PCR. Los 85 aislamientos se distribuyeron en los municipios estudiados de la siguiente manera; 29 (34,1%) en Temoaya; 16 (18,9%) en Tenango de Valle, 20 (23,5%) en Toluca y Zinacantepec (figura 1).

#### Caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de *S. aureus* resistentes a la meticilina

El patrón de sensibilidad *in vitro* a los antibióticos de *S. aureus* se muestra en el cuadro 2; todos los aislamientos mostraron sensibilidad a Trimetoprim-sulfametoxazol, mientras tanto que 43 (50,6%) fueron resistentes a ampicilina; 38 (44,7%) a penicilina, así como también a eritromicina; 17 (20%) a oxacilina y 4 (4,7%) a cefoxitina. Con relación a la prueba de oxacillin agar screen, 13 (15,3%) aislamientos fueron positivos, además todos los aislamientos resistentes a la penicilina fueron positivos al gen *blaZ*. De los 85 *S. aureus* solo 4 (4,7%) portaron el gen *mecA*, identificados como MRSA (cuadro 3), éstos fueron resistentes a oxacilina y además mostraron fenotipo de mutliresistencia.

#### Identificación de los genes *mecR1* y *mecI*.

En la detección de los genes reguladores, una cepa de campo fue positiva para los genes *mecRI* y *mecI* (grupo A); dos fueron positivas al dominio MS del gen *mecRI* (grupo C) y una fue negativa a los dos genes reguladores (grupo D); (cuadro 3); la distribución geográfica a la cual corresponden estos grupos de aislados, está representada en la figura 1.

## DISCUSIÓN

Este estudio, fue diseñado para identificar aislamientos de MRSA en vacas que pertenecen a unidades de producción lechera familiar en México, basándonos en el análisis de los genes reguladores *mecRI* y *mecI*.

El porcentaje de aislamiento de *S. aureus* en los hatos lecheros de producción familiar fue del 28,1%, concordando con otros estudios realizados en diferentes regiones de México, por ejemplo, el estudio realizado en la región centro-este del Estado de México, donde reportaron una tasa de positividad de *S. aureus* del 23,04% (Manjarrez y col 2012), por otra parte Ochoa-Zarzosa y col (2008), determinaron un 29,2% de frecuencia de *S. aureus* en hatos de Morelia, Michoacán, México. Se ha observado que la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* se relaciona a las deficientes condiciones de higiene presentes en los hatos lecheros a pequeña escala, con relación a lo anterior se ha demostrado que la mala higiene durante el ordeño contribuye significativamente al desarrollo de infección intraglandular mamaria por *S. aureus* y otros agentes de importancia clínica en la mastitis (Ávila y Gutiérrez 2002).

Los aislamientos de *S. aureus* estudiados, presentaron mayor resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y eritromicina. A diferencia de estos resultados, Ochoa-Zarzosa y col (2008) observaron que todos los aislamientos de *S. aureus* fueron resistentes a ampicilina, ceftazidima y penicilina. La resistencia se observó también en aquellos antibióticos que se utilizan frecuentemente en el tratamiento de la mastitis bovina, como los aminoglucósidos, tetraciclinas y macrólidos, lo cual concuerda con reportes previos (Kumar y col 2010).

El porcentaje de resistencia para eritromicina observado en este estudio (44,7%) fue elevado en comparación con los reportados por Valero-Leal y col (2010) en Venezuela y Pellegrino y col (2011) en Argentina, quienes informaron un 3,7% y 36,5%, respectivamente.

En contraste se han reportado mayores resistencias a los antibióticos comparados con nuestros resultados, destacando la investigación realizada por Li y col (2009) donde obtuvieron el 90,7% de

aislados resistentes a varios antibióticos; con mayor resistencia a penicilina y ampicilina (77,3%), del mismo modo, los resultados descritos por Daka y col (2012), mostraron mayores resistencias a los  $\beta$ -lactámicos, eritromicina y vancomicina, lo que pone de manifiesto la necesidad del seguimiento en las tendencias de la resistencia de *S. aureus* en la industria lechera.

De acuerdo a diversos estudios se observa una variación en cuanto al patrón de resistencia de *S. aureus* obtenidos de vacas lecheras (De Oliveira y col 2000, Gentilini y col 2000), estas diferencias en la resistencia se podrían atribuir a los diferentes antibióticos que se utilizan para el tratamiento de infecciones en el ganado bovino en las diferentes áreas geográficas dependiendo de la normatividad de cada país.

En este estudio, los 38 aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina portaron el gen *blaZ*, este resultado concuerda con el trabajo de Gao y col (2012). La importancia de detección de este gen en vacas lecheras se asocia a la persistencia de mastitis en el ganado, debido al fracaso terapéutico (Haveri y col 2007).

Cabe mencionar que solo 4 aislamientos de *S. aureus* portaron el gen *mecA* (4,7%) identificándose como MRSA, asimismo se han reportado frecuencias menores a las observadas en este estudio, que van del 1 a 1,5% de MRSA obtenidos de ganado bovino lechero (Lee 2003, Turutoglu y col 2009, Vandendriessche y col 2013). En contraste se han informado prevalencias más altas de MRSA en mastitis bovina que van del 10,2 al 13,1% en la India (Kumar y col 2010, Kumar y col 2011).

La identificación de *S. aureus* resistente a metilina en vacas lecheras desempeña un papel importante en la epidemiología ya que éstos representan un reservorio natural y el contacto con animales portadores puede implicar un riesgo para la salud humana (Fitzgerald 2012).

De igual manera se han identificado MRSA a partir de muestras de terneros, medio ambiente, leche en tanque, veterinarios, empleados de rastros y trabajadores de granjas (Huber y col 2010, Haran y col 2011, Lim y col 2013), asimismo en productos cárnicos (Vandendriessche 2013) y productos lácteos (Normanno y col 2007). El riesgo de transmisión de MRSA a los humanos a través de los alimentos puede ser bajo de acuerdo a algunos estudios, sin embargo no se puede descartar el riesgo que su presencia en productos lácteos conlleva (Lee 2003, Normanno y col 2007).

Todas las cepas MRSA se caracterizan por presentar el gen *mecA*, pero esto no sucede con otros genes involucrados en la expresión de la resistencia. Esto se fundamenta en estudios previos donde demuestran que del 60 al 95% de los *S. aureus* positivos a *mecA*, poseen los genes *mecRI* y *mecI* (Suzuki y col 1993, Kobayashi y col 1996). Además se ha concluido que los MRSA que expresan fenotípicamente la resistencia no poseen el gen *mecI* o se encuentra mutado, lo que evita la represión de la transcripción del gen *mecA* (Kobayashi y col 1998).

De los cuatro MRSA identificados, solo tres fueron positivos al gen *mecRI*, igual que la cepa control ATCC 43300; en contraste con el gen *mecI* el cual se detectó en una cepa. Estos resultados coinciden con estudios anteriores donde se identifica en menor proporción el gen *mecI* (Weller y col 1999, Lee 2006). Por su parte, Felten y col (2002), observaron que el 92,8% de los *S. aureus* estudiados portaban el gen *mecRI* podría estar truncado, además de que todos los aislamientos fueron negativos al gen *mecI*.

En este estudio, también identificamos que uno de los aislamientos de MRSA fue negativo a los genes *mecRI* y *mecI*, este hallazgo también ha sido descrito por Petinaki y col (2001) y Felten y col (2002) donde reportaron que el 14,3% y 4,8% de los MRSA fueron negativos a los genes reguladores respectivamente.

De acuerdo a la detección de los genes reguladores el 25% de los aislamientos estudiados se clasificaron en el grupo A, el 50% al grupo C y el 25% al grupo D. Nuestros resultados son diferentes a los reportados por Kobayashy y col (1996), donde el 94,3% de los MRSA correspondieron al grupo A; el 2,5% al grupo B y D y 0,8% al grupo C.

En el caso de los aislamientos de MRSA clasificados en el grupo C fueron fenotípicamente resistentes en ausencia del gen *mecI* que reprime la expresión del *mecA*. Del mismo modo, el aislamiento MRSA negativo a los genes reguladores, expresó la resistencia a la meticilina, en este caso es probable que existen otros mecanismos implicados en la expresión de la resistencia, como son los genes reguladores *blaRI* y *blaI*, ya que dicha cepa fue positiva al gen *blaZ* (Petinaki y col 2001). Futuros estudios sobre resistencia a la meticilina en aislamientos de MRSA de origen veterinario son necesarios para dilucidar su diversidad genética en nuestro país.

En conclusión los aislamientos de MRSA identificados en unidades de producción lechera familiar en el Estado de México muestran diferentes genotipos en cuanto a los genes *mecA*, *mecRI*

y *meclI*; además es el primer estudio que reporta estos genotipos en aislamientos de MRSA de vacas lecheras en México.

## RESUMEN

En México, al igual que en otros países el *Staphylococcus aureus*, es uno de los principales patógenos, identificados en la mastitis bovina. El tratamiento de esta enfermedad, se realiza principalmente utilizando antibióticos  $\beta$ -lactámicos; sin embargo en México existen reportes de *Staphylococcus aureus* resistente a este tipo de antibióticos, sin embargo, actualmente los mecanismos moleculares de MRSA no han sido ampliamente estudiados.

En este trabajo, se estudiaron aislamientos de *S. aureus* de bovinos, los cuales se identificaron por PCR del gen *femB*. La resistencia de los aislamientos a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue caracterizada por pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y por PCR de los genes *blaZ* y *mecA*; también se analizaron sus genes reguladores *mecRI* y *mecI*. Nuestros resultados mostraron una mayor resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a la eritromicina entre los *S. aureus* y solamente 38 (44,7%) fueron positivos al gen *blaZ*. Por otro lado, todos los *S. aureus* fueron probados para el gen *mecA*, y solo cuatro fueron positivos, estos fueron agrupados de la siguiente forma: uno fue positivo a los genes *mecI* y *mecRI* (grupo A), dos no presentaron el gen *mecI* ni el dominio PB del gen *mecRI* (grupo C) y uno no mostró ningún gen regulador (grupo D). En conclusión, nosotros identificamos la presencia de MRSA en unidades de producción lechera familiar en el Estado de México, y su resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos; analizada molecularmente, indicó, que esta, puede ser regulada por diferentes genotipos de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* presentes en MRSA.

*Key words:* *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, *mecA* gene, bovine

*Palabras clave:* *Staphylococcus aureus*, resistencia a meticilina, gen *mecA*, bovino

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a Margarita López Vázquez, con número de registro becario 265008, para cursar los estudios de Maestría en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de México (PCARN-UAEM).

## REFERENCIAS

- Ávila TS, CA Gutiérrez. 2002. Comparación del estado de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. *Vet Méx* 33, 387-394.
- Bautista-Trujillo GU, JL Solorio-Rivera, I Rentería-Solórzano, SI Carranza-Germán, JA Bustos-Martínez, RI Arteaga-Garibay, VM Baizabal-Aguirre, M Cajero-Juárez, A Bravo-Patiño, JJ Valdéz-Alarcón. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol* 62, 369-376.
- Chambers HF. 1997. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 10, 781-791.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Daka D, S G/silassie, D Yihdego. 2012. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11:26.
- De Oliveira AP, JL Watts, SA Salmon, FM, Aarestrup. 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci* 83, 855-862.
- Felten A, B Grandry, PH Lagrange, I Casin. 2002. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J Clin Microbiol* 40, 2766-2771.
- Fitzgerald JR. 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends Microbiol* 20, 192-198.
- Gao J, M Ferreri, F Yu, X Liu, L Chen, J Su, B Han. 2012. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. *Vet J* 192, 550-552.
- Gentilini E, G Denamiel, P Llorente, S Godaly, M Rebuelto, O De Gregorio. 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* 83, 1224-1227.

- Haran KP, SM Godden, D Boxrud, S Jawahir, JB Bender, S Sreevatsana. 2011. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *J Clin Microbiol* 50, 688-695.
- Haveri M, A Roslöf, L Rantala, S Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Applied Microbiol* ISSN 1364-5072.
- Hiramatsu K, Y Katayama, H Yuzawa, T Ito. 2002. Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 292, 67-74.
- Huber H, S Koller, N Giezendanner, R Stephan, C Zweife. 2010. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Euro Surveill* 5, 19542.
- Katayama Y, T Ito, K Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1549–1555.
- Kobayashi N, H Wu, K Kojima, K Taniguchp, S Urasawa, N Uehara, Y Omizu, Y Kishi, A Yagihashi, I Kurokawa. 1994. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of Staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 113, 259-266.
- Kobayashi N, K Taniguchi, K Kojima, S Urasawa, N Uehara, Y Omizu, Y Kishi, A Yagihashi, I Kurokawa, N Watanabe. 1996. Genomic diversity of mec regulator genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. *Epidemiol Infect* 117, 289-295.
- Kobayashi N, K Taniguchi, S Urasawa. 1998. Analysis of Diversity of Mutations in the *mecI* Gene and *mecA* Promoter/Operator Region of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 717-720.
- Kumar R, BR Yadav, RS Singh. 2010. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. *Curr Microbiol* 60, 379-386.
- Kumar R, BR Yadav, RS Singh. 2011. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *J Biosci* 36, 175-188.

- Lee JH. 2003. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Appl Environ Microbiol* 69, 6489-6494.
- Lee JH. 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes. *Vet Microbiol* 114, 155-159.
- Lewis RA, KG Dyke. 2000. *mecI* represses synthesis from the beta-lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 45, 139-144.
- Li J, H Zhou, L Yuan, T He, S Hu. 2009. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B* 10, 753-760.
- Lim SK, HM Nam, GC Jang, HS Lee, SC Jung, TS Kim. 2013. Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms. *Foodborne Pathog Dis* 10, 731-736.
- Manjarrez LAM, ZS Díaz, GF Salazar, CB Valladares, CAC Gutiérrez, PA Barbabosa, RM Talavera, FMU Alonso, OV Velázquez. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Rev Mex Cienc Pecu* 3, 265-274.
- Méndez y Cazarín MD, RT Rascón, DV Arreola. 2000. Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala. *Livest Res Rural Dev* 12:<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd12/1/manu121.htm>.
- NMC, National Mastitis Council. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc 2820 Madison, USA pp 47.
- Normanno G, M Corrente, G La Salandra, A Dambrosio, NC Quaglia, A Parisi, G Greco, AL Bellacicco, S Virgilio, GV Celano. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol* 117, 219-222.
- Ochoa-Zarzosa A, PD Loeza-Lara, F Torres-Rodríguez, H Loeza-Ángeles, N Mascot-Chiquito, S Sánchez-Baca, JE López-Meza. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 199-206.

- Pellegrino MS, ID Frola, LM Odierno, CI Bogni. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *REDVET* 12, 1-14.
- Petinaki E, A Arvaniti, G Dimitracopoulos, I Spiliopoulou. 2001. Detection of *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother* 47, 297-304.
- Schnellmann C, V Gerber, A Rossano, V Jaquier, Y Panchaud, MG Doherr, A Thomann, R Straub, V Perreten. 2006. Presence of New *mecA* and *mph(C)* Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. *J Clin Microbiol* 44, 4444-4454.
- Shore AC, EC Deasy, P Slickers, G Brennar, B O'Connell, S Monecke, R Ehricht, DC Coleman. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *blaz* and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 30 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3765-3773.
- Suzuki E, K Kuwahara-Arai, JF Richardson, K Hiramatsul. 1993. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1219-1226.
- Turutoglu H, M Hasoksuz, D Ozturk, M Yildirim, S Sagnak. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet Res Commun* 33, 945-956.
- Valero-Leal K, Y Olivares, A Perozo, E Valbuena, L Boscán, G Colina, W Briñez. 2010. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. *Revista científica* 20, 367-376.
- Vandendriessche S, W Vanderhaeghen, SF Valente, M Hallin, B Catry, K Hermans, P Butaye, F Haesebrouck, MJ Struelens, O Denis. 2013. Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother* 1-7.

- Weller TMA. 1999. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J Antimicrob Chemother* 43, 15-22.
- Wichelhaus TA, S Kern, V Schäfer, V Brade, KP Hunfeld. 1999. Evaluation of modern agglutination tests for identification of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18, 756-8.
- Zadoks RN, JR Middleton, S McDougall, J Katholm, YH Schukken. 2011. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 357–372.
- Zhang HZ, CJ Hackbarth, KM Chansky, HF Chambers. 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* 291, 1962-1965.

**Cuadro 1.** Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR y condiciones de amplificación

**Table 1.** Sequences of the primers used for PCR and amplification conditions

Gen	Secuencia de nucleótidos (5' → 3')	Tamaño amplicón (pb)	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>mecA</i>	Sentido: A.AAATCGATGGTAAAGGTTGGC Antisentido: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min; desnaturalización 94°C por 1 min; alineación: 55°C por 1 min; extensión: 72°C por 2 min. 30 ciclos, y extensión final a 72°C por 7 min.	Kobayashi y col (1994)
<i>femB</i>	Sentido: TTACAGAGTTAACTGTTACC Antisentido: ATACAAATCCAGCACGCTCT	651		
<i>mecR1A</i> (dominio MS)	Sentido: GTCTCCACGTTAATTCCA TT Antisentido: GTCGTTTCATTAAGATATGACG	310	Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min; desnaturalización 97°C por 1 min; alineación: 57°C por 1 min; extensión: 72°C por 2 min 30 ciclos, y extensión final a 72°C por 7 min.	Kobayashi y col (1996)
<i>mecR1B</i> (dominio PE)	Sentido: AAGCACCGTTACTATCTGCACA Antisentido: GAGTAAATTTGGTCTGAATGCC	236		
<i>mecI</i>	Sentido: AATGGCGAAAAA GCACA ACA Antisentido: GACTTGATTGTTTCCTCTGTT	481		
<i>blaZ</i>	Sentido: CAGTTCACATGCCAAA GAG Antisentido: TACACTCTTGCGGTTTC	772	Desnaturalización inicial: 94°C por 3 min; desnaturalización 94°C por 1 min; alineación: 50°C por 1 min; extensión: 72°C	Schnellmann y col (2006)

**Cuadro 2.** Sensibilidad *in vitro* a los antibióticos de *Staphylococcus aureus*

**Table 2.** *in vitro* sensitivity to antibiotics of *Staphylococcus aureus*

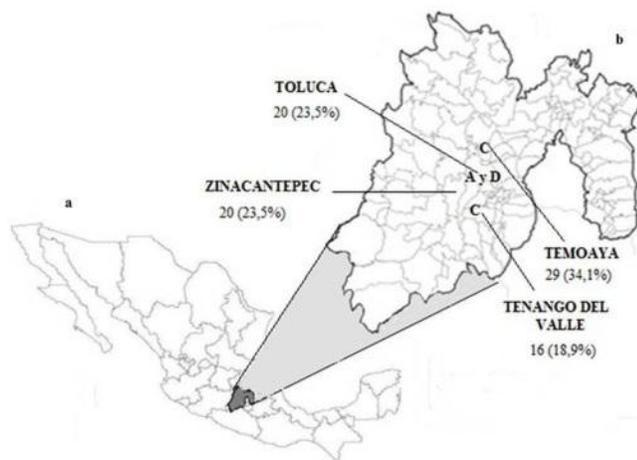
Antibióticos	No. (%) aislamientos	No. (%) aislamientos	No. (%) aislamientos
	sensibles	intermedios	resistentes
Penicilina	47 (55,3)	0 (0)	38 (44,7)
Oxacilina	62 (73,0)	6 (7,0)	17 (20,0)
Cefoxitina	81 (95,3)	0 (0)	4 (4,7)
Ampicilina	42 (49,4)	0 (0)	43 (50,6)
Amoxicilina/ácido			
clavulanico	76 (89,4)	0 (0)	9 (10,6)
Cefotaxima	49 (57,7)	12 (14,1)	24 (28,2)
Ceftazidima	1 (1,2)	6 (7,0)	78 (91,8)
Cefuroxima	73 (85,9)	2 (2,3)	10 (11,8)
Cefalotina	75 (88,2)	4 (4,8)	6 (7,0)
Gentamicina	81 (95,4)	2 (2,3)	2 (2,3)
Eritromicina	26 (30,6)	21 (24,7)	38 (44,7)
Tetraciclina	58 (68,2)	2 (2,3)	25 (29,5)
Trimetoprim- sulfametoxazol	85 (100,0)	0 (0)	0 (0)

**Cuadro 3.** Identificación de los genes reguladores en aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

**Table 3.** Identification of regulatory genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains

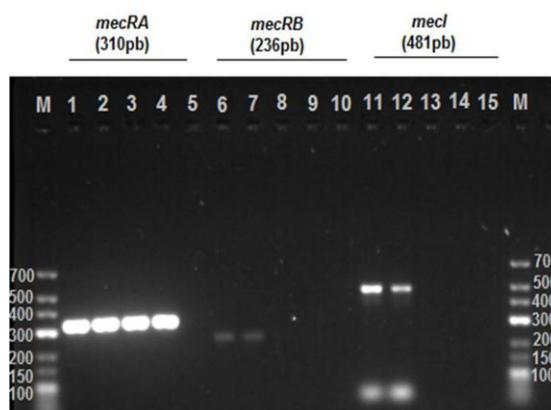
Cepa	Producto de PCR				Clasificación*
	<i>mecA</i>	<i>mecR1A</i> (MS)	<i>mecR1B</i> (PB)	<i>mecI</i>	
ATCC43300	+	+	+	+	A
25	+	+	+	+	A
15	+	+	-	-	C
113	+	+	-	-	C
20	+	-	-	-	D

(+)Presencia del gen; (-) ausencia del gen; \*clasificación propuesta por Suzuki y col (1993).



**Figura 1.** Distribución geográfica del número de aislamientos de *S. aureus*, identificados en cada municipio. Los cuatro aislados MRSA están representados en el mapa del Estado de México con su grupos correspondiente. **a**, mapa de México, **b**, mapa del Estado de México.

**Figure 1.** Geographical distribution of the number of *S. aureus* isolates identified in each municipality. The four MRSA isolates are represented on the map State of Mexico with their corresponding groups. **a**, map of Mexico, **b**, map State of Mexico.



**Figura 2.** Gel de agarosa al 2% donde se identifican los amplicones de las PCR de los genes reguladores *mecR1* y *mecI* de los aislamientos de MRSA. El carril M es el marcador de peso molecular; carril 1, 6 y 11, cepa control MRSA, ATCC 43300; carril 2, 7 y 12 aislamiento MRSA 25; carril 3, 8 y 13 aislamiento MRSA 15; carril 4, 9 y 14, aislamiento MRSA 113; carril 5, 10 y 15, aislamiento MRSA 20.

**Figure 2.** 2% agarose gel which identifies the PCR amplicons of *mecR1* and *mecI* genes from MRSA isolates. Lane M, molecular weight markers. Lanes 1, 6 and 11, MRSA strain control ATCC 43300; lanes 2, 7 and 12, MRSA isolate 25; lanes 3, 8 and 13, MRSA isolate 15; lanes 4, 9 and 14, MRSA isolate 113; lanes 5, 10 and 15 MRSA isolate 20.



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

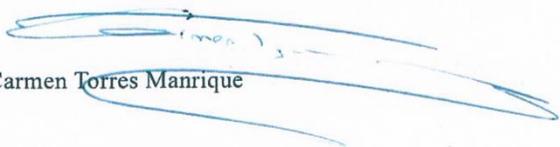
COMPLEJO CIENTÍFICO TECNOLÓGICO. Madre de Dios, 51. 26006 LOGROÑO (LA RIOJA) ESPAÑA. Tf. 941 299 720. Fax 941 299 721

**Carmen Torres Manrique**, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Agricultura y Alimentación la Universidad de La Rioja (Logroño, España),

**Manifiesta,**

La aceptación para que la **MVZ Margarita López Vázquez**, alumna del tercer semestre de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de México, realice una estancia durante el periodo **11 de febrero al 30 de abril del 2013**, en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja para llevar a cabo el entrenamiento en técnicas de Biología Molecular relativas al tipado molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y el estudio de genes de resistencia y de virulencia. Durante esta estancia acepto ser su tutora/asesora.

Logroño, 15 de Octubre de 2012

  
Carmen Torres Manrique

## Tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y estudio de genes de resistencia y virulencia.

### INTRODUCCIÓN

El *S. aureus* es el principal patógeno involucrado en la mastitis bovina, igualmente se encuentra relacionado con elevados porcentajes de resistencia a los antibióticos empleados en su tratamiento, particularmente a los  $\beta$ -lactámicos, esto ha favorecido la aparición de aislamientos de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA). En los últimos años, se han realizado trabajos orientados a detectar MRSA en los animales domésticos y de producción, particularmente en vacas y en cerdos (Haran *et al.*, 2011; Vandendriessche *et al.*, 2013; Arriola *et al.*, 2011); sin embargo, existe poca información respecto a la caracterización genética de los MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar en México.

### ESTANCIA ACADÉMICA

El objetivo de dicha estancia, fue tipificar aislamientos de *S. aureus*, obtenidos de bovinos lecheros del valle de Toluca, mediante la detección de mecanismos de resistencia, genes de virulencia; además, a través de la identificación de los genes *agr*, la tipificación por *spa* y los diferentes tipos de *Scmec*.

### Desarrollo técnico

Para llevar a cabo lo anterior, se seleccionaron 10 aislamientos de *S. aureus* de muestras de leche de vacas, tomando en cuenta su sensibilidad y resistencia a la meticilina, los cuales se caracterizaron por PCR mediante la detección de los genes *nuc* (específico de *S. aureus*) y *mecA* (gen de resistencia a meticilina); así como la región conservada del ARNr 16S siguiendo el protocolo descrito por CRL-AR, (2009).

Para la detección de los mecanismos de resistencia de estos aislamientos, se realizó en primer lugar, la prueba de sensibilidad *in vitro*. Esta prueba se hizo mediante el método de difusión en disco, de acuerdo al Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), en la cual se probaron los siguientes antibióticos: penicilina (10U), oxacilina (1 $\mu$ g),

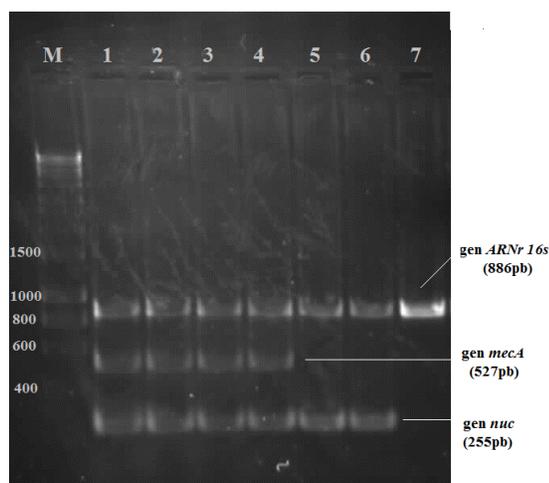
cefoxitina (30µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), estreptomycin (10 µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), clindamicina (2µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75µg), ácido fusídico(10µg), cloranfenicol (30µg), teicoplanina (30 µg), linezolid ( 30µg), mupirocina (200µg).

En segundo lugar, se determinaron por PCR específicas los genes que codifican la resistencia a dichos antibióticos (Schnellmann *et al.*, 2006; Sutcliffe *et al.*, 1996; Vakulenko *et al.*, 2003).

También se detectaron por PCR múltiple los genes de virulencia que codifican para la Leucocidina de Panton-Valentine (genes *lukS/F-PV*) (Lina *et al.*, 1999); *cna*; TSST-1(*tst*); toxinas exfoliativas, ETA, ETB y ETD (*eta*, *etb*, *etd*); hemolisinas alfa, beta, delta y gamma (*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*) (Jarraud *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2002).

La tipificación molecular de todos los aislamientos estudiados, se realizó mediante la secuenciación del ADN de la proteína A de *S. aureus* (*spa*) (Harmsen *et al.*, 2003), donde las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el software Ridom Staph-Type, versión de 1.5.21 (Ridom GmbH). La detección de los alotipos *agr* se llevó a cabo en dos PCR múltiple, de acuerdo a las condiciones descritas por Shopsisin *et al.*, (2003). Los aislamientos de *S. aureus* positivos al gen *mecA* (MRSA) fueron probados para la tipificación de los SCC*mec* (Kondo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2005).

Con base a los resultados obtenidos, se observó que tres aislamientos de *S. aureus* se identificaron como MRSA y siete fueron considerados como *S. aureus* meticilina sensibles (MSSA) (figura 1).



**FIGURA 1.** PCR-multiplex para la amplificación del fragmento del gen *nuc*, *mecA* y *16S*. El carril M es el marcador molecular Hyper ladder™ I (Bioline); carril 1 cepa control positiva C1920; carril 2 aislamiento MRSA 15; carril 3 aislamiento MRSA 25; carril 4 aislamiento MRSA 20; carril 5 aislamiento MSSA 260; carril 6 aislamiento MSSA143; carril 7 cepa control *S. epidermidis* ATCC 12228.

En la actualidad, se han realizado estudios orientados a identificar aislamientos de MRSA en vacas lecheras alrededor del mundo, en los cuales se observa una frecuencia de aislamiento del 1 al 13% (Lee, 2003; Turutoglu *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2007; Kumar *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2011). La importancia de detección de MRSA en los animales de producción, se fundamenta en estudios realizado por Kaszanyitzky *et al.*, (2007) y Turutoglu *et al.*, (2009), donde se demuestra la posibilidad de transmisión zoonótica de cepas MRSA entre animales y humanos.

En cuanto a la resistencia fenotípica a los diferentes antibióticos, todos los aislamientos MRSA fueron resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, sin embargo, se exhibieron diferentes patrones de resistencia a los demás antibióticos. Igualmente, fueron sensibles a cloranfenicol, mupirocina, linezolid, trimetoprim-sulfametoxazol, estreptomicina y tetraciclina. En cambio los aislamientos MSSA, fueron sensibles a todos los antibióticos testados, excepto un aislamiento que mostró fenotipo intermedio a eritromicina (cuadro 1).

Como se observa en el cuadro 1, los *S. aureus mecA* positivos mostraron resistencia múltiple a diferentes antimicrobianos, estos resultados coinciden con reportes previos, en donde los MRSA fueron resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, amiglocósidos, tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas (Ochoa-Zarsoza *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011; Haenni *et al.*, 2011).

**Cuadro 1:** Resistencia fenotípica y genotípica de los aislamientos de *S. aureus*.

Aislamiento	<i>mecA</i>	Fenotipo de resistencia	Fenotipo intermedio	Genes de resistencia
MRSA CA-15	+	PEN-OXA-FOX-E-CIP		<i>mphC, msrA, msrB, blaZ</i>
MRSA CA-20	+	PEN-OXA-CC <sup>i</sup> -TET-STR-TEICO-FA	E	<i>erm(A), Inu(A), mphC, blaZ</i>
MRSA CA-25	+	PEN-OXA-FOX-E-CC <sup>i</sup> -GEN-TOB		<i>erm(A), Inu(A), mphC, blaZ, ant4'-la, aac(6')-le-aph(2')</i> .
MSSA CA-36	-		E	<i>Inu(A), mphC</i>
MSSA CA-129	-			
MSSA CA-142	-			
MSSA CA-238	-			
MSSA CA-24	-			
MSSA CA-260	-			
MSSA CA-143	-			

Cc<sup>i</sup> resistencia inducida a clindamicina en presencia de eritromicina.

En los últimos años, la resistencia múltiple a los agentes antimicrobianos ha sido reportada en *S. aureus* aislados de leche de vacas con mastitis (Vanderhaeghen *et al.*,

2010; Peles *et al.*, 2007; Li, 2009). Lo anterior, es el reflejo del uso indiscriminado de los antibióticos, tanto en producción animal como en salud humana (Valero-Leal *et al.*, 2010).

Los aislamientos MRSA portaron el gen *blaZ*, relacionado con la resistencia a la penicilina. En cuanto a la resistencia a los macrólidos-lincosamidas, se observaron los genes *erm(A)*, *msrA*, *msrB* y *mphC* en diferentes combinaciones. Un aislamiento MRSA presentó los genes *ant4'-la* y *aac(6')-le-aph(2'')* que codifican resistencia a los aminoglucósidos (cuadro 1).

En la actualidad, los macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (MLS) se utilizan ampliamente en el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus* y la resistencia a dichos antibióticos es frecuente (Lina *et al.*, 1999). En el presente trabajo, dos MRSA fueron positivos a los genes *erm(A)* y *mphC*, relacionados con la resistencia a la eritromicina, también se detectó en estos aislamientos el gen *Inu(A)*. Por el contrario, el aislamiento MRSA CA-15 mostró los genes *mphC*, *msrA*, *msrB*, éstos también han sido reportados en *Staphylococcus* obtenidos de leche mastítica bovina en la India (Kumar *et al.*, 2010), en contraste con el estudio realizado por Ochoa-Zarsoza *et al.*, (2008), donde identificaron los genes *erm(B)*, *erm(C)*, *Inu(A)* y *msr(A)*.

Con respecto a los genes que codifican la resistencia a los aminoglucósidos, un MRSA fue positivo a los genes *aac(6')-le-aph(2'')* y *ant(4')-la*. Entre los mecanismos de resistencia a aminoglucósidos, el más frecuente es el mediado por el gen *aac(6')-le-aph(2'')* que se detecta en cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina. Este gen proporciona resistencia a todos los aminoglucósidos con excepción de la estreptomicina. Otro mecanismo de resistencia frecuente en las cepas MRSA es el mediado por el gen *ant(4')-la* (Torres y Cercenado, 2010).

En cuanto a la detección de los genes de virulencia, se obtuvo que todos los *S. aureus* estudiados fueron negativos a los genes codificantes de las toxinas exfoliativas (*eta*, *etb*, *etd*), así como también, al gen *tst*, que codifica para la toxina del síndrome del choque tóxico (TSST-1) (cuadro 2), estos resultados son similares a los descritos en

muestras de leche de vaca, reportados en diferentes países como, Hungría (Peles *et al.*, 2007), en EUA (Haran *et al.*, 2011) y en Alemania (Feßler *et al.*, 2010). Sin embargo, Monecke *et al.*, (2007) y Haenni *et al.*, (2011), detectaron *S. aureus* de origen bovino positivos a *tst*.

**Cuadro 2.** Factores de virulencia de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

Aislamiento	Genes de virulencia
15	cna, pvl, hla, hlb, hld
20	cna, hla, hlb
25	cna, hla, hlb, hld, hlg
36	cna, hla, hlb, hld
129	cna, hla, hlb, hld
142	cna, hla, hlb, hld
238	cna, hla, hlb, hld
24	cna, hla, hlb, hld
260	cna, hla, hlb, hld
143	cna, hla, hlb, hld

En cambio, todos los aislamientos fueron positivos al gen *cna* y a los genes de las hemolisinas *hla* y *hlb*; nueve fueron positivos a *hld* y un aislamiento al gen *hlg* (cuadro 2); con relación a estos resultados Monecke *et al.*, (2007), reportó que todos los aislamientos de *S. aureus* fueron positivos a *hla*, *hld* y *hlg* y negativos a *hlb*, en cambio Kumar *et al.*, (2011), observaron un 94.3% de positividad a *hlb*.

En este trabajo, los genes *hla* y *hnb* que codifican las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, fueron los más predominantes en los *S. aureus* estudiados. Por su parte, Franco *et al.*, (2008) detectaron el 78% de los *S. aureus* portadores de hemolisinas, de los cuales el 12 % portaron la  $\alpha$ -hemolisina, el 29 % correspondió a  $\beta$ -hemolisina y el 37 % mostró ambas hemolisinas.

Adicionalmente a estos genes de virulencia detectados, el aislamiento MRSA CA-15 presentó el gen *lukS/F-PV* que codifica a la toxina PVL, este resultado también fue observado por Haran *et al.*, (2011), en *S. aureus* obtenidos de muestras de leche en tanque; sin embargo, existen estudios donde los *S. aureus* de muestras de leche fueron negativos a este factor de virulencia (Haenni *et al.*, 2011; Feßler *et al.*, 2010).

Con relación a lo anterior, sólo una minoría (2-3%) de *S. aureus* la producen y se caracteriza por provocar destrucción leucocitaria y necrosis tisular. Este hallazgo es interesante debido a que esta toxina se considera un determinante genético del clon USA300 de origen humano (Millar *et al.*, 2007). Su presencia se asocia a infecciones por *S. aureus* de adquisición comunitaria (CA-MRSA), asimismo con infecciones de piel y partes blandas y neumonías necrotizantes con una mortalidad elevada (Lina *et al.*, 1999).

En el presente estudio 6 *spa*-tipos fueron encontrados de los cuales t89, t114 y t007 fueron los más predominantes, aunque también se encontraron los *spa*-tipos t008, t543 y t237 (cuadro 3). La identificación de diversos *spa*-tipos asociados a vacas lecheras, nos indica que la población de *S. aureus* en las unidades de producción lechera familiar estudiadas es diversa.

En diferentes países, se han determinado los *spa*-tipos asociados a *S. aureus* obtenidos de muestras de leche de vacas. En Bélgica, los *S. aureus* se relacionaron a los *spa*-tipos t011, t567 y t108 (Bardiau *et al.*, 2013); en Corea Hwang *et al.*, (2010), se detectaron 14 *spa*-tipos, t164, t2094, t1987, t286, t127, t148, t324, t664, t1151, t519, t034, t1456, t002, t008; en México, García-Rodríguez *et al.*, (2013), los *spa*-tipos con mayor

frecuencia en su estudio fueron 1965 (23.08%), t605 (17.95), t4570 y t267 (15.38%); además, se identificaron los en menor proporción t224, t008, t189, t211, t265 y t693.

**Cuadro 3.** Tipificación molecular de *Staphylococcus aureus*

Aislamiento	<i>agr</i>	<i>spa</i> tipo	<i>Sccmec</i>
15	I	t008	Iva
20	III	t007	II
25	III	t007	II
36	I	t237	
129	I	t189	
142	III	t114	
238	I	t189	
24	I	t189	
260	I	t543	
143	III	t114	

De igual manera, se identificaron los tipo *agr* I y III, en los aislamientos de *S. aureus*, en cuanto a los aislamientos de MRSA, dos portaron el *SCCmec* tipo II y uno el tipo IVa (cuadro 3).

Con los resultados anteriores, se observó que el aislamiento MRSA CA-15 fue tipificado como t008-*agr*I-*SCCmec* IVa y PVL positivo, este hallazgo parece indicar que dicho aislamiento pertenece al CC8 (USA 300) de origen humano, lo que confirma la habilidad de este clon de adaptarse a diferentes hospederos (Sakwinska *et al.*, 2011). Sin

embargo, para confirmar si pertenece a este complejo clonal es necesaria la tipificación por MLST de dicho aislamiento.

La importancia de identificar este tipo de aislamientos en vacas lecheras radica en que éstas cepas juegan un papel importante en la transmisión de la infección dentro del hato; así como también, estos animales representan un reservorio natural para la infección al hombre, favoreciendo la amplificación de la infección (Lee, 2003; Voss *et al.*, 2005; Weese *et al.*, 2005).

Podemos concluir que los *S. aureus* estudiados mostraron diferentes patrones de resistencia a los antibióticos probados, mostrando la tendencia de poseer resistencia múltiple, además, estos aislamientos fueron positivos a las hemolisinas, y uno portó la PVL. La identificación de un aislamiento MRSA perteneciente al complejo clonal 8, confirma la presencia de cepas MRSA de origen humano en la población bovina lechera, por lo que existe transmisión de cepas MRSA del hombre a la vaca o viceversa.



AJUCHITLÁN, COLÓN, QUERÉTARO A 16 DE AGOSTO DE 2012

**ESTIMADO(S) INVESTIGADOR(ES):**

En nombre del Comité Organizador y del Comité Científico de la XLVIII Reunión Nacional de investigación Pecuaria, me es grato comunicarle(s) que su resumen con el número de folio "783" TITULADO:

**"VARIACIÓN GENÉTICA POR POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL GEN *coa* EN LOS ANTIBIOTIPOS DE OXACILINA EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* EN HATOS LECHEROS DE PRODUCCIÓN FAMILIAR DE TEMOAYA, ESTADO DE MÉXICO. "**

**AUTORES:**

VELÁZQUEZ OV1, LÓPEZ VM1\*, TALAVERA RM1, ZAMORA EJL1, VALDEZ AJJ2, BAUTISTA TGU2.,

Ha sido **ACEPTADO** por el Comité Científico para ser presentado durante la Reunión.

Se expide la presente constancia para los fines legales que a los autores les convengan.

Sin más por el momento quedo de usted(es)

ATENTAMENTE

DR. RICARDO BASURTO GUTIÉRREZ.  
PRESIDENTE DEL COMITÉ CIENTÍFICO DE LA XLVIII RNIP-2012



"Ciencia, tecnología y desarrollo de capacidades para la adaptación y mitigación del cambio climático"



**MVZ MARGARITA LOPEZ VAZQUEZ**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MEXICO**  
**P R E S E N T E**

Estimado(a) MVZ Margarita López Vázquez:

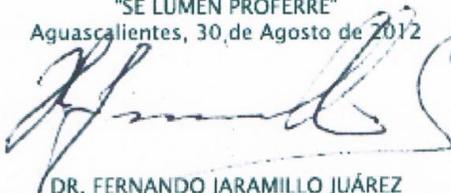
Por este medio me permito informarle que su trabajo titulado "VARIACIÓN GENÉTICA DEL ANTIBIOTIPO METICILINA RESISTENTE DE AISLAMIENTOS de *Staphylococcus aureus* DE ORIGEN BOVINO EN EL VALLE DE TOLUCA." fue ACEPTADO para participar en la modalidad PONENCIA dentro del Tercer Congreso Internacional "La Investigación en el Posgrado" que se llevará a cabo los días 17, 18 y 19 de Octubre del presente año en la Unidad de Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Le informamos que se ofrecerán talleres sin costo con cupo limitado, por lo que le sugerimos estar al pendiente para que pueda registrarse con tiempo. Los talleres son:

- Redacción Científica
- Estrategias Docentes
- Investigación Cualitativa
- Uso y Manejo del SPSS en la investigación Científica

Sin más por el momento me despido de usted, aprovechando la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"  
Aguascalientes, 30 de Agosto de 2012



DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ  
DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



## VIII Congreso Internacional de Epidemiología León, Guanajuato

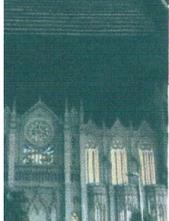
México, D.F. a 23 de agosto de 2013



López, V. Margarita.  
**Presente**



Con un amable saludo nos dirigimos a usted para informarle que el Comité Científico de la Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria, revisó su trabajo intitulado: "IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* CON RESISTENCIA BORDERLINE (BORSA) AISLADAS DE VACAS LECHERAS", cuyo dictamen fue de: ACEPTADO, bajo la modalidad de CARTEL, por lo que para poder ser considerado en el programa científico del VIII Congreso Internacional de Epidemiología; a celebrarse del 25 al 28 de Septiembre del año en curso, en el Fórum Cultural Guanajuato. Deberá de enviar por correo electrónico ([amevac1@gmail.com](mailto:amevac1@gmail.com)), copia del comprobante de pago correspondiente por concepto de inscripción al evento.



Una vez registrada su inscripción, se le asignará el día y la hora en que deberá de presentar su trabajo, bajo la modalidad especificada.



Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un afectuoso saludo.



**ATENTAMENTE**

**Dr. Evaristo Alvaro Barragán Hernández**  
Coordinador del comité Científico.



## IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la identificación de aislamientos MRSA en vacas, de unidades de producción lechera familiar en el valle de Toluca, asimismo, se caracterizaron los genotipos de los genes *mecR1* y *mecl*.

El porcentaje de aislamiento de *S. aureus* en las unidades de producción lechera familiar previamente estudiadas, fue del 28.1 %. Este resultado se encuentra entre los porcentajes reportados en estudios previos, realizados en el valle de Toluca, donde la prevalencia de *S. aureus* fue del 23% al 66% (García y Tapia, 2006; Alcántara y Sánchez 2006; Manjarrez, 2012), por otra parte Ochoa-Zarzosa *et al.*, (2008), determinaron un 29,2% de frecuencia de *S. aureus* en hatos de Morelia, Michoacán, México. Es por ello que el nivel de infección por *S. aureus* en el hato, depende de su prevalencia en la población y la dinámica de la infección asociada con los factores de virulencia propios del agente (Wolter *et al.*, 2004).

La importancia de la detección de *S. aureus* en vacas lecheras, se debe a que este microorganismo causa comúnmente mastitis subclínica, la cual se asocia a grandes pérdidas económicas, debido a la reducción en la producción láctea; a cambios en la composición de la leche, lo que afecta la elaboración de quesos; al sacrificio temprano de las vacas y a los costos en el tratamiento, además, afecta el valor higiénico de la leche (Seegers *et al.*, 2003; Velázquez *et al.*, 2005).

Los métodos para controlar y prevenir la mastitis bovina se basan en programas de higiene durante el ordeño, la terapia de las vacas secas y el tratamiento con antibióticos (Chaffer y Rimbaud, 2005), esta última práctica en muchas ocasiones conlleva a la selección de aislamientos de *S. aureus* resistentes, lo cual interfiere de manera negativa en el tratamiento (Wolter *et al.*, 2004). Además, otro aspecto desfavorable, resulta de la acumulación de residuos de antibióticos en el animal y su implicación en la salud humana (Pellegrino *et al.*, 2011).

Los fármacos de primera elección utilizados para el tratamiento de la enfermedad, son los  $\beta$ -lactámicos, seguidos por los macrólidos, aminoglucósidos y lincosamidas. Entre estas familias de antibióticos, los *S. aureus* exhiben una mayor resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (Gentilini *et al.*, 2000).

En el estudio, los aislamientos de *S. aureus* presentaron mayor resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Estos resultados son similares a estudios realizados en otros países, como el descrito por Schmidt, (2011), donde reportó que el 47.8% de los *S. aureus* fueron resistentes a la penicilina y el 65.6% a ampicilina, en KwaZulu-Natal, Sudáfrica. Por su parte, Gao *et al.*, (2012), reportaron un 96.3% de resistencia a la penicilina y 66.0% a eritromicina en Beijing, China.

A diferencia de estos resultados, en México, Franco *et al.*, (2008), determinaron un porcentaje de *S. aureus* resistente a la penicilina y oxacilina del 68% y 69%, respectivamente. De igual manera, Ochoa-Zarzosa *et al.*, (2008) observaron que todos los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de vacas lecheras, fueron resistentes a ampicilina, ceftazidima y penicilina.

Los aislamientos de *S. aureus* estudiados fueron resistentes a la ceftazidima (91.8%), ampicilina (50.6%) y penicilina (44.7%). En contraste se han reportado mayores resistencias a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos comparados con nuestros resultados, destacando la investigación realizada en China por Li y col (2009) donde obtuvieron el 90.7% de cepas resistentes a varios antibióticos; con mayor resistencia a penicilina y ampicilina (77.3%). Resultados similares han sido observados en diferentes países (Daka *et al.*, 2012; El Behiry *et al.*, 2012), lo que pone de manifiesto la necesidad del seguimiento en las tendencias de la resistencia de *S. aureus* en la industria lechera.

El porcentaje de resistencia de *S. aureus* observado en este estudio para eritromicina (44.7%) fue mayor en comparación con los reportados por Valero-Leal *et al.*,

(2010) y Faría Reyes *et al.*, (2005) en Venezuela, y Pellegrino *et al.*, (2011) en Argentina, quienes informaron un 3.7%, 10% y 36.5%, respectivamente.

En cuanto a los aislamientos resistentes a la tetraciclina y gentamicina la frecuencia fue menor a la reportada en granjas lecheras en la India, donde la resistencia fue del 36% y 30% respectivamente (Kumar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011), de igual manera en Turquía se reportó que el 100% y el 93.8% de los *S. aureus* fueron resistentes a gentamicina y tetraciclina respectivamente (Türkyilmaz *et al.*, 2010).

Como podemos notar entre los diferentes estudios reportan una variación en cuanto al patrón de resistencia de *S. aureus* obtenidos de vacas lecheras, estas diferencias en la resistencia se podrían atribuir a los diferentes antibióticos que se emplean para el tratamiento de la mastitis en las diferentes áreas geográficas, dependiendo de la normatividad de cada país (De Oliveira *et al.*, 2000; Waage *et al.*, 2002).

Con relación a los resultados anteriores, se observó el fenotipo de multiresistencia en los aislamientos de *S. aureus* estudiados. En los últimos años, la problemática de la multiresistencia a los agentes antimicrobianos en *S. aureus* aislados de vacas lecheras, se ha profundizado debido a la carencia de políticas reguladoras sobre el uso de los antibióticos con fines terapéuticos en medicina veterinaria (Valero-Leal *et al.*, 2010). La principal importancia radica en que se favorece la transferencia horizontal de estos aislamientos multiresistentes de los animales al hombre, dejando claro que el uso inapropiado de antibióticos constituye un riesgo emergente para la salud pública (Pellegrino *et al.*, 2011).

Los 38 aislamientos resistentes a la penicilina evaluados en la sensibilidad *in vitro*, fueron positivos al gen *bla<sub>Z</sub>*, lo que confirma la acción de las  $\beta$ -lactamasas como mecanismo de resistencia en estos aislamientos. En este contexto, se ha descrito la modalidad de resistencia con niveles de resistencia bajos, por hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas, en la que no se demuestra la presencia del gen *mecA*, a este grupo se le ha

catalogado *Staphylococcus aureus* con resistencia borderline (BORSA) (Camarena y Sánchez, 2003).

El resultado anterior concuerda con el trabajo de Gao *et al.*, (2012), donde demostraron que todos los aislamientos resistentes a penicilina fueron positivos al gen *blaZ*, además, este gen se detecta comúnmente en aislamientos de *S. aureus* de muestras de leche (Zschöck *et al.*, 2011; Feßler *et al.*, 2010). La importancia de detección de este gen en vacas lecheras se debe a que se asocia a la persistencia de mastitis en el ganado, debido al fracaso terapéutico (Haveri *et al.*, 2007).

La frecuencia de aislamiento de *S. aureus* resistente a los  $\beta$ -lactámicos se relaciona con el antibiograma MRSA, en el presente estudio se identificaron por PCR del gen *mecA*, cuatro (4.7%) aislamientos como MRSA, este valor es similar a los descritos por Haran *et al.*, (2011) y Bardiau *et al.*, (2013). Asimismo se han reportado frecuencias menores de MRSA obtenidos de ganado bovino lechero, en Japón, Turquía y Bélgica, que van del 1 a 1,5% (Lee 2003; Turutoglu *et al.*, 2009; Vandendriessche *et al.*, 2013).

De acuerdo a los estudios realizados entre los años, 1997 al 2004 y 2003 al 2009, en diferentes regiones de Corea se reportó una frecuencia de MRSA en muestras de leche del 1.5% y 4.2% respectivamente (Moon *et al.*, 2007; Holmes y Zadoks, 2011). En contraste se han informado prevalencias más altas de MRSA en mastitis bovina que van del 10.2 al 13.1% en la India (Kumar y col 2010, Kumar y col 2011), además en Bélgica se reportó un 9.3% de MRSA (Vanderhaeghen *et al.*, 2010).

De igual manera, se han identificado MRSA a partir de otras fuentes como pueden ser: terneros, medio ambiente, leche en tanque, veterinarios, empleados de rastros y trabajadores de granjas (Huber *et al.*, 2010; Haran *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2013), también en productos cárnicos (Vandendriessche, 2013) y productos lácteos (Normanno *et al.*, 2007). Algunos de estos trabajos concluyen que los aislamientos estudiados no son de origen animal y que la mayoría procede de personas que tienen contacto con los animales (Turutoglu *et al.*, 2009; Sakwinska, 2011; Haenni *et al.*, 2011).

La identificación de *S. aureus* MRSA en vacas lecheras desempeña un papel importante en la epidemiología de la infección ya que éstos representan un reservorio natural y el contacto con animales portadores puede implicar un riesgo para la salud humana (Cuny *et al.*, 2010; Fitzgerald, 2012; Bardiau *et al.*, 2013).

Asimismo, el riesgo de transmisión de MRSA a los humanos a través de los alimentos puede ser bajo de acuerdo a algunos estudios, sin embargo no se puede descartar el riesgo que su presencia en productos lácteos conlleva (Lee, 2003; Normanno *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que todos los aislamientos con el genotipo MRSA se caracterizan por presentar el gen *mecA*, no es así con otros genes involucrados en la expresión de la resistencia a la meticilina. Esto se fundamenta con estudios previos donde demuestran que del 60 al 95% de los *S. aureus mecA* positivos poseen los genes reguladores *mecR1* y *mecI* (Suzuki *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1996).

De los cuatro MRSA identificados en esta investigación, solo tres fueron positivos al gen *mecR1*, en contraste, con el gen *mecI* el cual se detectó solo en un aislamiento. Estos resultados coinciden con estudios anteriores de otros autores, donde todos los MRSA fueron positivos a *mecR1* y en menor proporción al gen *mecI* (Weller, 1999; Lee, 2006). Por su parte, Felten *et al.*, (2002), observaron que el 92,8% de los *S. aureus* estudiados portaban el gen *mecR1* y podría estar truncado, además de que todos los aislamientos fueron negativos al gen *mecI*. Sin embargo, un aislamiento MRSA fue negativo a *mecR1* y *mecI*, este hallazgo también fue observado por Petinaki *et al.*, (2001), donde reportaron que el 12.2% de los MRSA fueron negativos a los genes reguladores.

De acuerdo a la detección de los genes reguladores, un aislamiento se clasificó en el grupo A (25%), dos al C (50%) y uno al D (25%). Nuestros resultados son diferentes a los reportados por Kobayashi *et al.*, (1996), en un trabajo realizado con cepas

hospitalarias de origen humano, donde el 94.3% de los MRSA correspondieron al grupo A; el 2.5% al grupo B y D y 0.8% al grupo C.

Los aislamientos del grupo C se caracterizaron por tener deleciones del dominio PB del gen *mecR1* y del gen *mecl*, en este caso Chambers, (1997) menciona que la producción de PBP2a es inducible debido a que pueden estar involucrados los genes reguladores *blaR1* y *blaI*.

Se ha estudiado que las cepas MRSA aisladas del hombre, que expresan fenotípicamente la resistencia no poseen el gen *mecl* o se encuentra mutado, lo que evita la represión de la transcripción del gen *mecA* (Kobayashi *et al.*, 1998). Con respecto a esto, los MRSA obtenidos en la década de 1970 muestran deleciones en el dominio PB del *mecR1*, mientras tanto los aislamientos actuales tienden a presentar polimorfismo en el gen *mecl* y mutaciones en el promotor *mecA* (Suzuki *et al.*, 1993; Hurlimann *et al.*, 1992).

En nuestro estudio, el aislamiento MRSA CA-25 y la cepa ATCC 43300 positivas al gen *mecl*, no mostraron mutaciones, a pesar de que expresaron fenotípicamente resistencia. El análisis de las secuencias mostraron ser idénticas a la cepa N315 pre-MRSA (GenBank no. de acceso X63598.1; Hiramatsu *et al.*, 1992).

En este contexto, destaca el estudio realizado por Weller, (1999), donde reportó diez MRSA de origen humano positivos al gen *mecl*, de los cuales cuatro presentaron secuencias similares a la de referencia y seis mostraron en el nucleótido 202 una sustitución de C por T, resultando en un codón de terminación en el centro del marco de lectura abierto, esta mutación también fue descrita por Suzuki *et al.*, (1993) y Kobayashi *et al.*, (1998).

Comparando nuestros resultados con el único estudio realizado en MRSA de origen bovino, observaron que de los 12 MRSA positivos al gen *mecl*, 9 tuvieron secuencias

idénticas a la de referencia y los 3 restantes portaron una sustitución de C por T en el nucleótido 202 (Lee, 2006).

En este caso, las secuencias conservadas en estos aislamientos, sugieren que existe otro mecanismo para la evadir la represión de la resistencia mediada por el gen *mecl* (Weller, 1999; Lee, 2006). Futuros estudios sobre la resistencia a la meticilina en cepas MRSA de origen veterinario son necesarios para dilucidar su diversidad genética.

## X. CONCLUSIONES

Se identificaron 85 *S. aureus* a partir de muestras de leche, siendo todo positivos al gen *femB*.

Los aislamientos de *S. aureus* mostraron un mayor porcentaje de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a eritromicina. Los 38 aislamientos resistentes a la penicilina, fueron positivos al gen *blaZ*.

4.7% de los *S. aureus* portaron el gen *mecA*, mostrando resistencia múltiple.

En la clasificación de los genes reguladores, el aislamiento MRSA CA-25 y la cepa ATCC 43300, pertenecieron al grupo A, los MRSA CA-15 y CA-113 se asignaron al grupo C y por último el aislamiento MRSA CA-20 perteneció al grupo D.

Las secuencias del gen *mecI* fueron idénticas a la secuencia de referencia N315 pre-MRSA.

## XI. LITERATURA CITADA

- Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE. (1999): Frequency of  $\alpha$  and  $\beta$ -haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS.*, 107:425-430.
- Arriola CS, Güere ME, Larsen J, Skov RL, Gilman RH, Gonzalez AE, Silbergeld EK. (2011): Presence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs in Perú. *PLoS ONE* 6(12):e28529. doi:10.1371/journal.pone.0028529.
- Ávila TS y Gutiérrez CA. (2002): Comparación del estado de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. *Vet Méx.*, 33:387-394.
- Bardiau M, K Yamazaki, Duprez JN, Taminiau B, Mainil JG, Ote I. (2013): Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated From Milk Of Bovine Mastitis. *Lett Appl Microbiol.*, 57(3): 181-186.
- Bautista-Trujillo GU, Solorio-Rivera JL, Rentería-Solórzano I, Carranza-Germán SI, Bustos-Martínez JA, Arteaga-Garibay RI, Baizabal-Aguirre VM, Cajero-Juárez M, Bravo-Patiño A, Valdéz-Alarcón JJ. (2013): Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol.*, 62:369–376.
- Benoit SR, Estivariz C, Mogdasy C, Pedreira W, Galiana A, Galiana A, Bagnulo H, Gorwitz R, Fosheim GE, McDouga LK, Jernigan D. (2008): Community Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as Potential Cause of Healthcare-associated Infections, Uruguay, 2002–2004. *Emerg Infect Dis.*, 14(8):1216-1223.
- Berger-Bachi B y Rohrer S. (2002): Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. *Arch Microbiol.*, 178: 165-171.

- Bernal MLR, Rojas GMA, Vázquez FC, Espinoza OA, Estrada FJ, Castelán OOA. (2007): Determinación de la calidad fisicoquímica de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del Estado de México. *Vet Méx.*, 38 (4): 395-407.
- Brody T, Yavatkar AS, Lin Y, Ross J, Kuzin A, Kundu M, Fann Y, Odenwald WF. (2008): Horizontal Gene Transfers Link a Human MRSA Pathogen to Contagious Bovine Mastitis Bacteria. *PLoS ONE*, 3(8):1-8.
- Bustos MJA, Hamdan PA, Gutiérrez CM. (2006): *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed.*, 17:287-305.
- Camarena JJ y Sánchez R. (2003): Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. <http://www.seimc.org/control/revibacte/sarm.htm>(23 de septiembre 2012).
- Chaffer M y Rimbaud E. (2005): Epidemiología, prevención y control de la mastitis en los animales domésticos. Enfermedades de importancia económica en producción animal. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Chambers HF. (1997): Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev.*, 10(4): 781–791.
- Chambers HF y DeLeo F. (2009): Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7:629-641.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CRL-AR, Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance. (2009): Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus* National Food Institute. Technical University of Denmark.

- Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W. (2010): Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol.*, 300:109-117.
- Daka D, G/silassie S, Yihdego D. (2012): Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11:26
- de Oliveira AP, Watts JL, Salmon SA, Aarestrup FM. (2000): Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci.*, 83:855-862.
- Deresinski S. (2005): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis.*; 40:562-573.
- Deurenberg HR y Stobberingh EE. (2008): The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 747-763.
- ECDC/EMA, European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency (2009): Technical report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm, Sweden: ECDC/EMA; [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf)
- El Behiry A, Schlenker G, Szabo I, Roesler U. (2012): *in vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *J Vet Sci.*, 13(2):153-161.
- Ender M, McCallum N, Berger-Bächi B. (2008): Impact of *mecA* promoter mutations on *mecA* expression and  $\beta$ -lactam resistance levels. *International J Med Microbiol.*, 298: 607-617.
- Faría Reyes J, Valero-Leal K, D'Pool G, García UA, Allara CM. (2005): Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Revista Científica*, 15 (3):227-234.

- Feßler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. (2010): Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. J Antimicrob Chemother., 65: 619-625.
- Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. (2002): Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. J Clin Microbiol., 40(8): 2766–2771.
- Fitzgerald JR. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends Microbiol., 20:192-198.
- Fluit ADC, Maarten R. Visser MR, Franz-Josef Schmitz FJ. (2001): Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev., 14(4): 836–871.
- Franco G JC, González V L, Gómez MSC, Carrillo GJM, Ramírez CJJ. (2008): Análisis de los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en México. e-Gnosis, 6, 1-9.
- Gao J, Ferreri M, Yu F, Liu X, Chen L, Su J, Han B. (2012): Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. Vet J., 192: 550–552
- García AC. (2011): *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. Acta Med Per., 28(2):159-162.
- García GA, Tapia RR. (2006): Detección de las cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistentes (ORSA), en unidades de producción lechera de tipo familiar. Tesis de licenciatura, FMVZ-UAEM., Toluca, México.
- García-Rodríguez FR, Carmona-Gasca CA, Ángel-Andrés D, Solorio-Rivera J L, Sánchez-Gil LG, Rentería-Solórzano I, Baizabal-Aguirre VM, Cajero-Juárez M, Bravo Patiño A, Chávez Moctezuma MP, Valdez-Alarcón JJ. (2013): Distribución modular de secuencias simples repetidas en la región xr del gen *spa* en aislados de *Staphylococcus aureus* de granjas de traspatio. Memorias del VIII Congreso Internacional De Epidemiología.

- Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, De Gregorio O. (2000): Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J Dairy Sci., 83:1224-1227.
- Gil DM. (2000): *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilicina. Rev Chil Infect., 17(2):145-152.
- Gordon RJ y Lowy FD. (2008): Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis., 46: 1-16.
- Graveland H, Duimb B, van Duijkerenb E, Heederika D, Wagenaarb JA. (2011a): Mini Review Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. Int J Med Microbiol., 301: 630– 634.
- Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D. (2011b): Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. PLoS One 6, e16830.
- Grumann D, Nubel U, Broker BM. (2013): *Staphylococcus aureus* toxins. Their functions and genetics. Infect Genet Evol., <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>.
- Haenni M, Galofaro L, Ponsin C, Bes M, Laurent F, Madec JY. (2011): Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. J Antimicrob Chemother., 66: 216–225.
- Haran KP, SM Godden, D Boxrud, S Jawahir, JB Bender, S Sreevatsana. (2011): Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. J Clin Microbiol., 50, 688-695.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, and Ulrich V (2003): Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J Clin Microbiol. 41:5442-5448.
- Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. (2007): Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. J Applied Microbiol., ISSN 1364-5072.

- Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. (2004): Pathogenesis of bacterial infections in animals. Third edition. Blackwell publishing, EUA.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. (2001): The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol., 9:486-93
- Hiramatsu k, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. (2002): Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol., 292: 67-74.
- Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. (1992): Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). FEBS Lett. 298, 133–136.
- Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T, Baba T. (2004): Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Vaccine, 22S: S5-S8.
- Holmes MA y Zadoks RN. (2011): Methicillin Resistant *S. aureus* in Human and Bovine Mastitis. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 16:373-382.
- Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweife C. (2010): Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. Euro Surveill 5, 19542.
- Huijsdens XW, ijke BJ, Spalburg E, Santen-Verheuvél MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJB, de Neeling AJ. (2006): Community-acquired MRSA and pig-farming. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 5(26):1-4
- Hurlimann-Dalel RL, Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B. (1992): Survey of the Methicillin Resistance-Associated Genes *mecA*, *mecRI-mecI*, and *femA-femB* in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemothe., 36 (12): 2617-2621.
- Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. (2007): Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol., 189(23):8719–8726.
- Hwang SY, Park YK, Koo HC, Park YH. (2010): *spa* typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. J Vet Sci., 11(2): 125-131.

- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estados Unidos Mexicanos (2007): Censo Agropecuario. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. (2004): Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Ch.*, 48: 2637-51.
- IWG-SCC, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2009): Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. (Commentary). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12): 4961–4967.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. (2002): Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 70:631-641.
- Jiménez QJN y Correa OMM. (2009): *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *IATREIA*, 22(2):147-158.
- Kanafani ZA y Fowler VG. (2006): *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 24:182-93.
- Kaszanyitzky EJ, Jánosi S, Somogyi P, Dán A, Graaf-van Bloois L, Duijkeren E, Wagenaar JA. (2007): MRSA Transmission Between Cows and Humans. *Emerg Infect Dis.*, 13(4):630-632.
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. (2000): A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Ch.*, 44:1549–1555.
- Kawada MM y Komatsuzawa H. (2012): Factors affecting susceptibility of *Staphylococcus aureus* to antibacterial agents. *J Oral Biosciences.*, 54: 86–91.
- Keefe G. (2012): Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Vet Clin Food Anim.*, 28, 203–216

- Kennedy DA y DeLeo RF. (2009): Epidemiology and Virulence of Community-Associated MRSA. *Clinica Microbiol Newsletter* 31(20):153-160.
- Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. (1998): Analysis of Diversity of Mutations in the *mecI* Gene and *mecA* Promoter/Operator Region of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Ch.*, 42(3): 717-720.
- Kobayashi N, Taniguchi K, Kojima K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A, Kurokawa I, Watanabe N. (1996): Genomic diversity of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. *Epidemiol Infect.*, 117:289-295.
- Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A, Kurokawa I. (1994): Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.*, 113: 259-266.
- Kondo Y, Ito T, Xue Ma X, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. (2007): Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51(1): 264-274.
- Kumar R, Yadav BR, Singh RS. (2010): Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. *Curr Microbiol.*, 60: 379-386.
- Kumar R, Yadav BR, Singh RS. (2011): Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *J Biosci.*, 36, 175-188.
- Lee JH. (2003): Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Am Society Microbiol.*, 69(11):6489-6494.
- Lee JH. (2006): Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Vet Microbiol.*, 114:155–159.

- Leonard FC y Markey BK. (2008): Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *The Veterinary Journal* 175: 27-36.
- Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørnum M, Skov RL. (2008): Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.*, 14(9):1383-1389.
- Li J, Zhou H, Yuan L, He T, Hu S. (2009): Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ .Sci. B.*, 10(10):753-760.
- Lilenbaum W, Nunes EL, and Azeredo MA. (1998): Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Lett Appl Microbiol.*; 27:224-228.
- Lim SK, Nam HM, Jang GC, Lee HS, Jung SC, Kim TS. (2013): Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms. *Foodborne Pathog Dis.*, 10:731-736.
- Lin YC, Lauderdale TL, Lin HM, Chen PC, Cheng MF, Hsieh KS, Liu YC. (2007): An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in patients of a pediatric intensive care unit and high carriage rate among health care workers. *J Microbiol Immunol Infect.*, 40(4):325-34.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. (1999): Involvement of Panton- Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.*, 29:1128-1132.
- Lindsay AJ. (2010): Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J Med Microbiol.*, 300: 98-103.
- Llarrull LI, Fisher JF, Mobashery S. (2009): Molecular Basis and Phenotype of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Insights into New  $\beta$ -Lactams That Meet the Challenge. *Antimicrob Agents Ch.*, 53(10):4051-4063.
- López VM, Velázquez OV, Alonso FMU, Díaz ZS, Pulido GG. (2011): Identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (ORSA/MRSA) y con

resistencia borderline (BORSA) aisladas de vacas lecheras en el valle de Toluca. XXXV Congreso Nacional de Buiatría.

- Lowy FD. (1998): *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339: 520–532.
- Lowy FD. (2003): Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest., 111:1265-1273.
- Ma XX, Galiana A, Pedreira W, Mowszowicz M, Christophersen I, Machiavello S, Lope L, Benaderet S, Buella F, Vincentino W, Albini M, Bertaux O, Constenla I, Bagnulo H, Llosa L, Ito T, Hiramatsu K. (2005): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerg Infect Dis., 11:973–976.
- Manjarrez LAM, Díaz ZS, Salazar GF, Valladares CB, Gutiérrez CAC, Barbabosa PA, Talavera RM, Alonso FMU, Velázquez OV. (2012): Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. Rev Mex Cienc Pecu 3: 265-274.
- Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. (2010): Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. Braz J Infect Dis., 14:S79-86.
- Méndez y Cazarín MD, Rascón RT, Arreola DV. (2000): Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala. Livest Res Rural Dev 12:<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd12/1/manu121.htm>.
- Merethe HA y Ericson SJU. (2006): SCCmec in *Staphylococci*: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol., 46:8-20.
- Millar BC, Loughrey A, Elborn JS, Moore JE. (2007): Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). J Hosp Infect., 67:109-113.
- Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehrlich R. (2007): Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. Vet Microbiol., 125:128-140.
- Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. (2007): Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. J Dairy Sci., 90:1176-1185.

- Morell EA y Balkin, DM. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Pervasive Pathogen Highlights the need for new Antimicrobial development. *Yale J Biol Med.*, 83:223-233.
- National Mastitis Council (NMC) (1999): Laboratory and book on Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc 2820 Madison, USA pp. -47.
- Nilsson IM, Hartford O, Foster T, Tarkowski A. (1999): Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infect Immun.* 67:1045-1049.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. (2007): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol.*, 117:219-222.
- Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodríguez F, Loeza-Ángeles H, Mascot-Chiquito N, Sánchez-Baca S, López-Meza JE. (2008): Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94:199-206.
- Oliver SP y Murinda SE. (2012): Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Vet Clin Food Anim* 28:165-185.
- Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztúri P, Kardos G, Turcsányi I, Béri B, Szabó A. (2007): Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol.*, 118: 186–193
- Pellegrino MS, Frola ID, Odierno LM, Bogni CI. (2011): Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *REDVET.*, 12(7):1-14.
- Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. (2001): Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother* 47, 297-304.

- Pinto FJ, Anderson KL, Correa MT, Lyman R, Ruffin F, Reller LB, Fowler Jr.VG. (2011): Transmission of MRSA between Companion Animals and Infected Human Patients Presenting to Outpatient Medical Care Facilities. PLoS ONE 6(11): e26978.
- Plata K, Rosato AE, Węgrzyn G. (2009): *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimica Polonica. 56 (4):597-612.
- Seegers H, Fourichon C y Beaudeau F. (2003): Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet Res. 34(5):475-49.
- Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P. (2011): *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. Appl Environ Microbiol., 77(17): 5908-5915.
- Shinefield HR y Ruff NL. (2009): Staphylococcal Infections: A Historical Perspective. Infect Dis Clin N Am., 23: 1-15.
- Schmidt T. (2011): *In vitro* Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains From Dairy Herds in Kwazulu-Natal. J S Afr Vet Assoc., 82(2):76-9.
- Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, Thomann A, Straub R, Perreten V. (2006): Presence of New *mecA* and *mph(C)* Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. J Clin Microbiol., 44: 4444-4454.
- Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. (2003): Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J Clin Microbiol., 41:456-459.
- Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, Jong A, Harmsen HJM, Raangs GC, Stokroos I, Arends JP, Dubois JYF, van Dijk JM. (2006): Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. Microbiol. Mol Biol Rev., 70 (3): 755-788.

- Soca PM, Suárez YE, Soca PM, Rivero J, Fuentes CM, Alberto PC. (2005): Comparación de la incidencia epizootiológica de la mastitis clínica en dos rebaños lecheros después del uso del agua para la antisepsia final del pezón. *Redvet.*, 6 (3): 30-35.
- Stapleton PD y Taylor PW. (2002): Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation *Sci Prog.*, 85(1): 57-72.
- Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, MacKenzie FM. (2012): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Ag.*, 39:273-282.
- Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C, Cuny C, Verspohl J, Witte W, Schwarz S. (2006): Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J Antimicrob Chemother.*, 57:461-465.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, and Wondrack L. (1996): Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.*, 40:2562-2566.
- Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsul K. (1993): Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1219-1226.
- Thomas D, Chou S, Dauwalder O, Lina G. (2007): Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy.*, 93, 24-41.
- Torres C y Cercenado E. (2010): Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28(8):541-553.
- Türkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B. (2010): Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Hlth.* 57(3):197-203
- Turutoglu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S. (2009): Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet Res Commun.*, 33: 945-956.

- Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. (2003): Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47(4):1423-1426.
- Valero-Leal K, Olivares Y, Perozo A, Valbuena E, Boscán L, Colina G, Briñez W. (2010): Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. *Revista científica*, 20:367–376.
- Van den Eede A, Martens A, Lipinska U, Struelens M, Deplano A, Denis O, Haesebrouck F, Gasthuys F, Hermans K. (2009): High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Vet Microbiol.*, 133:138-144.
- van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, Neeling A, Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J. (2007): Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. *Emerg Infect Dis.*, 13(12):1834-1839.
- Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Valente SF, Hallin M, Catry B, Hermans K, Butaye P, Haesebrouck F, Struelens MJ, Denis O. (2013): Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *J Antimicrob Chemother* 1-7.
- Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol.*, 144,166-171.
- Vasquez MA, García RG, Lobo OM. (2008): Asociación de los genes implicados en la codificación de proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) con la expresión fenotípica de resistencia a la meticilina en cepas de *Staphylococcus* spp. *Rev. Cuadernos* 53(1):31 -37.
- Velázquez MME. (2005): Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metiliclorresistente. *Salud Pública de México*, 47(5):381-387.

- Velázquez MME, Ayala GJ, Carnalla BMN, Soto NA, Guajardo LCE, Echaniz AG. (2011): Letters to the Editor First Report of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) in México. J Clin Microbiol., 49 (8): 3099-3100.
- Velázquez OV, Pescador SN, Saltijeral OJ, Gorodezky LC. (2005): Epidemiología, prevención y control de la mastitis por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras. Enfermedades de importancia económica en producción animal. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Velázquez OV, Pescador SN, Gorodezky LC Saltijeral OJ. (2008): *in vitro* differential neutrophil phagocytosis activity on *Staphylococcus aureus* when obtained from blood and milk of dairy cows in early lactation period. Rev Lat Microbiol., 50(3):66-71.
- von Eiff C, Friedrich AW, Peters G, Becker K. (2004): Prevalence of genes encoding for members of the Staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis., 49:157-162
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. (2005): Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg Inf Dis., 11:1965-1966.
- Waage S, Bjorland J, Caugant DA, Oppegaard H, Tollersrud T, Mørk T, Aarestrup FM. (2002): Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline within and between dairy herds. Epidemiol Infect., 129: 193-202.
- Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Hanssen AM, Kohn B, Brunenberg L, Lübke-Becker A. (2008): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. Vet Microbiol., 127:171-178.
- Wax RG, Lewix K, Salyers AA, Taber H. (2008): Bacterial Resistance to Antimicrobial. Second Edition. CRC Press.
- Wayne DW. (2007): Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4<sup>a</sup> ed., Limusa, México.

- Weese JS, Rousseau J, Traub-Dargatz JL, Willey BM, McGeer AJ, Low DE. (2005): Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. J Am Vet Med Assoc., 226:580-583.
- Weller TMA. (1999): The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. J Antimicrob Chemother 43, 15-22.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis., 5: 751-762.
- Wichelhaus TA, Kern S, Schäfer V, Brade V, Hunfeld KP. (1999): Evaluation of modern agglutination tests for identification of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18, 756-8.
- Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, Zschöck M. (2004): Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, México.
- Wulf MW, Sørum M, van Nes A, Skov R, Melcher WJG, Klaassen CHW. (2008): Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. Clin Microbiol Infect., 14(1):29-34.
- Xu SX y McCormick JK. (2012): Staphylococcal superantigens in colonization and disease. Front Cellular Infection Microbiol., 2 (52): 1-11.
- Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai M. (2002): Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun., 70(10):5835-5845.
- Yoong P y Torres VJ. (2013): The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. Curr Opin Microbiol., 16:63-69.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. (2011): Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. J Mammary Gland Biol Neoplasia., 16:357-372.

- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, and Conly JM. (2005): Novel Multiplex PCR Assay for Characterization and Concomitant Subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol., 43:5026-5033.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Tan J, Conly JM. (2008): Coexistence of Pantone-Valentine leukocidin-positive and -negative community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. J Infect Dis., 197:195e204.
- Zschöck M, El-Sayed A, Eissa N, Lämmle C, Castañeda-Vázquez H. (2011): Resistencia a penicilina G y oxacilina, de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina subclínica. Vet Méx., 42 (3): 207-217.

## VII. ANEXOS

### ANEXO 1. MÉTODO DE 0.5 MCFARLAND

1. Agregar .5mL de 0.048 mol/L de  $\text{BaCl}_2$  (1.175% w/v  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99.5 mL de 0.18 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% v/v), en constante agitación hasta obtener una suspensión.
2. Verificar la correcta densidad de la turbidez mediante la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro. La absorbancia a 625nm debería de ser 0.08 a 0.13 para el standard de McFarland.
3. Transferir la suspensión de sulfato de bario en alícuotas de 4 a 6 mL.
4. Guardar los tubos en un lugar oscuro a temperatura ambiente.
5. Antes de cada uso mezcla vigorosamente la solución.
6. Verificar cada mes la densidad.

## **ANEXO 2. PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCION DE ADN**

*Thermo Scientific Genejet Genomic Dna Purification Kit*

- Buffer de lisis:

20mM Tris-HCl (ph 8.0)

2mM EDTA

1.2% Triton X-100

Lisozima 20mg/mL agregar inmediatamente antes de usarse.

1. Colocar  $2 \times 10^9$  de células bacterianas en un tubo de 2mL y centrifugar por 10 min a 5000 x g. Desechar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 $\mu$ L del buffer de lisis e incubarlo por 30 min a 37°C.
3. Agregar 200 $\mu$ L de la solución de lisis y 20 $\mu$ L de proteinasa K, mezclar con vortex obteniendo una suspensión uniforme.
4. Incubar la muestra a 56°C, vortex ocasionalmente hasta que las células sean completamente lisadas (~30 min).
5. Agregar 20 $\mu$ L de RNase A, mezclar con vortex e incubar a temperatura ambiente por 10 min.
6. Agregar 400 $\mu$ L de etanol 50% y mezclar.
7. Transferir el lisado al tubo en columna del kit. Centrifugar por 1 min a 6000 x g. Descartar el tubo de colección conteniendo el líquido y pasar la columna dentro de un tubo nuevo.
8. Agregar 500 $\mu$ L de buffer de lavado I (con el etanol agregado). Centrifugar por 1 min a 8000 x g.
9. Agregar 500 $\mu$ L de buffer de lavado II. Centrifugar por 3 min a más de 12000 x g. Opcional si quedan residuos centrifugar por 1 min a 13 000 x g y cambiar de tubo.
10. Agregar 200 $\mu$ L de buffer de elución en el centro de la membrana. Incubar por 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 8000 xg.

### **ANEXO 3. PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR**

#### *QIAquick PCR Purification Kit Protocol*

- Añadir etanol (96-100%) al Buffer PE antes de su uso.
  - Todos los pasos de centrifugación son a  $\geq 10.000$  xg (~ 13.000 rpm).
1. Añadir 5 volúmenes de buffer PB a 1 volumen de la muestra y la mezcla de PCR.
  2. Colocar la columna de QIAquick en un tubo de 2 ml.
  3. Agregar el producto de PCR a la columna QIAquick y centrifugar durante 30-60s.
  4. Deseche el filtrado.
  5. Para lavar, añadir 0,75 ml de tampón PE a la columna QIAquick y centrifugar durante 30-60 s.
  6. Desechar el sobrenadante y colocar la columna QIAquick en el mismo tubo.
  7. Colocar la columna QIAquick en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
  8. Añadir 50 $\mu$ l de buffer EB (10 mM de Tris · Cl, pH 8,5) o H<sub>2</sub>O en el centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna durante 1 min. Alternativamente, para aumentar la concentración de ADN, añadir 30  $\mu$ l de tampón de elución, se deja reposar la columna durante 1 min, y luego centrifugar.