

Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán

Molecular characterization of *Staphylococcus* spp. isolates associated with bovine mastitis in Tarímbaro, Michoacán, Mexico

Joel Edmundo López Meza^a, Jorge Ernesto Higuera Ramos^a, Alejandra Ochoa Zarzosa^a, Omar Chassin Noria^a, Juan José Valdez Alarcón^a, Alejandro Bravo Patiño^a, Víctor Manuel Baizabal Aguirre^a

RESUMEN

La mastitis es una enfermedad que afecta al ganado bovino lechero a nivel mundial, provocando una disminución en la calidad y cantidad de la leche producida, lo cual genera pérdidas económicas considerables. Esta enfermedad es causada por una variedad de microorganismos, entre los cuales *Staphylococcus aureus* es uno de los más importantes. El objetivo del trabajo fue caracterizar 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de la glándula mamaria de vacas lactantes con mastitis en un sistema de producción de traspatio, mediante el uso de polimorfismos derivados de la amplificación al azar de ADN (RAPD's) y su sensibilidad hacia trece antibióticos y 1 detergente. Las pruebas de sensibilidad a los 13 antibióticos demostraron que todos los aislamientos fueron resistentes a penicilina y sensibles a cefalotina, eritromicina y trimetoprim. Todos los aislamientos fueron susceptibles a una concentración menor de 6 µg/ml de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB). La caracterización molecular permitió determinar que los aislamientos SA7 y SA8, SA30 y SA32, presentaron una similitud superior al 90 % en el patrón de bandas obtenida por RAPD, mientras que los aislamientos SA35 y SA36 fueron idénticos, sin embargo, el resto de los aislamientos presentaron perfiles de amplificación distintos. Los aislamientos SA7 y SA8, SA30 y SA32, SA35 y SA36, tuvieron patrones de resistencia a antibióticos y de RAPD similares, por lo que probablemente se trató de reaislamientos. Los aislamientos de *Staphylococcus* de Tarímbaro, Michoacán presentaron una diversidad de perfiles de amplificación.

PALABRAS CLAVE: Mastitis bovina, *Staphylococcus*, RAPD, Resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

Mastitis is a disease of dairy cattle worldwide that causes decreased milk quality/yield, resulting in major economic losses. Mastitis is caused by a wide variety of organisms, including *Staphylococcus aureus* as a major pathogen. The purpose of this research was to characterize 20 *Staphylococcus* spp. isolates from the mammary gland of mastitic, lactating, backyard cattle, using both the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis, and sensitivity tests to 13 antibiotics and 1 detergent. Sensitivity tests to 13 antibiotics showed that all isolates were resistant to penicillin but sensitive to cephalothin, erythromycin, and trimethoprim. All isolates were susceptible to a <6 µg/ml cethyl-trimethyl ammonium bromide (CTAB) concentration. Molecular characterization aided to determine that isolates SA7 & SA8, SA30 & SA32, showed >90% similarity in the RAPD band pattern, while isolates SA35 & SA36 were identical to each other. Nevertheless, all other isolates showed different amplification profiles. Isolates SA7 & SA8, SA30 & SA32, SA35 & SA36 had similar antibiotic resistance/RAPD patterns, suggesting re-isolation. *Staphylococcus* isolates collected in Tarímbaro, Michoacán showed several different amplification patterns.

KEY WORDS: Bovine Mastitis, *Staphylococcus*, RAPD, Antibiotic resistance.

A nivel mundial la mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes en la industria lechera, debido a que ocasiona pérdidas económicas

Bovine mastitis is a major disease affecting the dairy industry that results in economic losses and decreased animal health. The National Mastitis

Recibido el 26 de noviembre de 2004 y aceptado para su publicación el 15 de julio de 2005.

^a Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, AP 53, Administración Chapultepec, 58262 Morelia, Michoacán, México. Tel. y Fax: (443) 295 80 29. baizabal@zeus.umich.mx. Correspondencia al último autor.

y afecta la salud de los animales. El Consejo Nacional de Mastitis estima una pérdida promedio de 225 USA dólares anuales por vaca en el hato, de los cuales 78, son atribuidos a casos de mastitis clínica. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación intramamaria grave en uno o más cuartos de la ubre, lo que ocasiona un bajo rendimiento en la producción de leche y un cambio en sus características organolépticas⁽¹⁾. El daño al epitelio mamario causa la pérdida de la capacidad productora de leche en los cuatro cuartos de la ubre.

Se han aislado al menos 137 microorganismos diferentes de glándulas mamarias de bovino afectadas de mastitis⁽²⁾, los cuales se clasifican en contagiosos o ambientales, de acuerdo con su capacidad de establecerse en la glándula mamaria. Entre los patógenos contagiosos se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*; algunos ejemplos de ambientales son *Streptococcus uberis*, enterobacterias, y especies del género *Staphylococcus* diferente a *aureus*. Aunque existen diversos grupos de microorganismos asociados a la mastitis, la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos contagiosos prevalentes, y responsable de las infecciones subclínicas y clínicas en la glándula mamaria de vacas lactantes⁽³⁾. El reservorio principal de *S. aureus* se localiza en los cuartos de la glándula mamaria de la vaca, y con frecuencia ocurre una transmisión horizontal de la bacteria entre el ganado durante la ordeña. Una vez que *S. aureus* ha causado un daño considerable al epitelio mamario, la patología suele complicarse por infecciones con microorganismos oportunistas.

Aunque las pruebas bioquímicas tradicionales usadas para la identificación de bacterias son importantes para establecer la identidad del microorganismo que causa la infección del epitelio mamario, no aportan información acerca de la variabilidad genética entre las cepas bacterianas recuperadas. El empleo de marcadores moleculares para la identificación de polimorfismos derivados de la amplificación al azar de ADN (RAPD's, del inglés "Random Amplified Polymorphic DNA"), es una técnica útil para revelar la relación entre el origen del huésped y la variación

Council estimates average annual losses of US\$225/cow in the herd, out of which US\$78 are attributed to clinical mastitis. Mastitis is characterized by serious intramammary inflammation in one or more quarters, resulting in milk organoleptic changes and reduced milk yield⁽¹⁾. Damaged mammary epithelium decreases milk production ability in all four udder quarters. At least 137 different organisms have been isolated from mastitic cattle udders⁽²⁾. These organisms are classified as either contagious or environmental, in agreement with their ability to get settled in the mammary gland. Contagious pathogens include *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus dysgalactiae*. Environmental pathogens include, among others, *Streptococcus uberis*, enterobacteria, and non-*aureus* *Staphylococcus* species. Even though several groups of organisms are associated with mastitis, the Gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* is a prevailing contagious pathogen, responsible for clinical and subclinical infections of the mammary gland of lactating cows⁽³⁾. Given that the main *S. aureus* reservoir is the mammary quarter, horizontal transmission among cows during milking frequently occurs. Once *S. aureus* has caused considerable damage to the mammary epithelium, pathology can be complicated by opportunistic infections.

Even though the biochemical tests traditionally used for bacterial identification are important to identify the organism infecting the mammary epithelium, such tests provide no information about the genetic variability of bacterial isolates. The use of molecular markers to identify polymorphisms derived from the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) test, is a technique that can be used to reveal the relationship between host origin and genetic variations among *Staphylococcus* spp. isolates, as shown by the genetic heterogeneity analysis among *S. aureus* isolates from the mammary gland of dairy cattle in different regions of the world^(4,5,6,7). The RAPD technique is versatile and it is used to amplify randomly-distributed areas within the genome. Furthermore, this technique is rapid, requires a small amount of DNA, demands no previous sequence knowledge, and allows distinguishing numerous organisms rapidly and simultaneously. In

genética entre los aislamientos de *Staphylococcus*, como lo demuestran los análisis de heterogeneidad genética entre cepas de *S. aureus* aisladas de la glándula mamaria de bovinos lecheros en distintas regiones del mundo^(4,5,6,7). La técnica de RAPD es versátil y se usa para amplificar áreas distribuidas al azar en el genoma. Además, es una técnica rápida, requiere poco ADN, no presupone conocimientos previos sobre la secuencia, y se pueden distinguir rápida y simultáneamente numerosos organismos. En México existen reportes acerca de la microbiología asociada a la mastitis bovina. En ellos se describe de manera general la presencia de bacterias del género *Staphylococcus*, destacando la presencia de *S. aureus*, *S. intermedius*, estafilococos coagulasa-negativos así como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, bacterias de los géneros *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, enterobacterias, micoplasmas, levaduras y algas⁽⁸⁻¹³⁾. Sin embargo, a la fecha no se han obtenido datos acerca de perfiles de amplificación de ADN, aplicando técnicas como RAPD's, de cepas de *S. aureus* aisladas de la glándula mamaria de bovinos con mastitis subclínica y clínica.

Una característica importante en los aislados microbianos de muestras de glándula mamaria bovina afectada con mastitis. Es común que las cepas de *S. aureus* desarrollen resistencia a una variedad de antibióticos o detergentes elaborados a base de compuestos cuaternarios de amonio (QAC, del inglés "Quaternary Ammonium Compounds"), utilizados con frecuencia para desinfectar los utensilios y la ubre del ganado en los hatos lecheros^(14,15,16). Debido al uso indiscriminado de estos compuestos, se ha incrementado en el mundo el interés por estudiar la resistencia a desinfectantes y antisépticos codificada en moléculas de ADN extracromosómico o plásmidos en cepas de *S. aureus*^(17,18,19).

El ganado que participa en la producción de leche en México se divide en especializado (17 %) y no-especializado (83 %), que comprende la producción semiespecializada, la de doble-propósito y la de traspatio⁽²⁰⁾. En Michoacán la producción de leche en sistemas de traspatio representa una fuente de ingresos económicos importante.

Mexico, reports on bovine mastitis-associated microbiology have been published, generally describing the presence of bacteria within the *Staphylococcus* genus, namely *S. aureus*, *S. intermedius*, and coagulase-negative staphylococci, as well as *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, bacteria of the *Actinomyces*, *Corynebacterium*, and *Bacillus* genera, enterobacteria, *Mycoplasma*, yeasts and algae⁽⁸⁻¹³⁾. Nevertheless, no DNA amplification profiles have been obtained so far applying techniques such as RAPD, on *S. aureus* strains from the mammary gland of cattle with subclinical or clinical mastitis.

One important, common trait of microbial isolates from mastitic cow udders is that *S. aureus* strains become resistant to a variety of antibiotics or quaternary ammonium compound (QAC)-based detergents, that are frequently used on both tools and udders in dairy herds^(14,15,16). Due to the indiscriminate use of these compounds, growing interest exists in the world to study the resistance to disinfectants and antiseptics coded in *S. aureus* extra-chromosomal (plasmid) DNA molecules^(17,18,19).

Bovine milk production in Mexico is based on specialized (17 %) and non-specialized (83 %) cows, the latter including semi-specialized, dual purpose (beef/milk), and backyard milk production⁽²⁰⁾. In the State of Michoacán, backyard milk production represents an important income source.

The purpose of this research was to demonstrate that the 20 *Staphylococcus* spp. isolates collected from the milk of backyard, mastitic, lactating cows, in the municipality of Tarímbaro, State of Michoacán, Mexico show different amplification patterns, as an approach to determine the diversity of staphylococci that might be present in milk samples. *Staphylococcus* spp. polymorphic amplification patterns were determined using the RAPD technique. QAC/antibiotic sensitivity was also determined for each isolate. Results show that *Staphylococcus* spp. isolates have different DNA amplification/antibiotic resistance profiles. Furthermore, genetic similarities were established among isolates using a genetic diversity analysis.

El propósito de este trabajo consistió en demostrar que los 20 aislados de *Staphylococcus* spp., recuperados de la leche de vacas lactantes con mastitis, mantenidas en un sistema de producción de traspatio en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, presentan patrones de amplificación distintos, como una aproximación para determinar la diversidad de especies de *Staphylococcus* que pudieran estar presentes en las muestras. Los patrones de amplificación polimórficos de los aislados de *Staphylococcus* spp., se determinó con la técnica de RAPD's. Se evaluó también la susceptibilidad a QAC y la sensibilidad a antibióticos de cada aislamiento. Los resultados indican que los aislamientos de *Staphylococcus* spp., presentan perfiles de amplificación de ADN diferentes y de resistencia a antibióticos; además, se pudieron establecer las relaciones de similitud genética entre los aislamientos, mediante un análisis de diversidad genética.

Las muestras de leche se colectaron de 20 vacas lactantes mantenidas en nueve establos de traspatio en el municipio de Tarímbaro, Michoacán. El diagnóstico de la mastitis se realizó con la prueba de California. La leche se colectó en tubos estériles y se conservó a 4 °C (máximo de tres días) hasta su procesamiento. Para la obtención de los aislamientos de *Staphylococcus* spp., se tomaron alícuotas de 200 µl de la leche colectada y se distribuyeron en cajas de Petri con agar sangre. Las cajas se colocaron a 37 °C durante 18 a 24 h. Posteriormente, se identificaron las colonias por observación al microscopio y pruebas bioquímicas (catalasa, coagulasa, gelatinasa y fermentación del manitol). Además, recientemente el cultivo de los 20 aislados en agar sal-manitol resultó positivo. Esta caracterización inicial se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo para el Diagnóstico (USAD) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Los aislamientos se subcultivaron en medio semi-sólido Luria-Bertani (10 g tripton, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, por cada 1,000 ml de agua) cada 45 días para mantener viables a las bacterias. Como referencia se utilizó la cepa certificada de *S. aureus* subsp. *aureus* (27543) aislada de un caso de mastitis clínica,

Milk samples were obtained from 20 lactating cows in nine backyard dairies in Tarímbaro, Michoacán. Mastitis was diagnosed using the California Mastitis Test (CMT). Milk was collected in sterile test tubes, and samples were stored at 4 °C for a maximum of 3 d, until processed. For *Staphylococcus* spp. isolation, 200 µl milk aliquots were distributed among blood agar plates. Plates were incubated at 37 °C for 18 to 24 h. Colonies were identified by both microscopic observation and biochemical tests (catalase, coagulase, gelatinase, and mannitol fermentation). In addition, a fresh culture of all 20 isolates in mannitol/salt agar yielded positive results. This initial characterization was performed in the Unit for Supportive Diagnostic Services, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, San Nicolás de Hidalgo Michoacán University (*Unidad de Servicios de Apoyo para el Diagnóstico, USAD, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, UMSNH*). Each 45 d, isolates were subcultured in semi-solid Luria-Bertani's medium (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, in 1,000 ml water) for bacteria to remain viable. A certified *S. aureus* subsp. *aureus* reference strain isolated from clinical mastitis, American Type Culture Collection (ATCC) 27543 was used.

Staphylococcus spp. antibiotic sensitivity tests (3 repetitions) were performed using the disc diffusion assay on Mueller-Hinton's (MH) (Bioxon) agar plates. QAC susceptibility tests were performed by incorporating the detergent to MG agar medium in Petri dishes. Gram positive (Bio-Rad) sensitivity discs were used in the antibiotic sensitivity tests. Thirteen (13) antibiotics were evaluated, i.e.: ampicillin, 10 µg; cephalothin, 30 µg; cefotaxime, 30 µg; ceftazidime, 30 µg; cefuroxime, 30 µg; dicloxacillin, 1 µg; erythromycin, 15 µg; gentamicin, 10 µg; pefloxacin, 5 µg; penicillin, 10 U; tetracycline, 30 µg; trimethoprim, 25 µg, and lincomycin, 10 µg/ml (Pharmacia). Bacteria were incubated at 37 °C for 18 h, and isolates were classified as resistant, intermediate, moderately sensitive, or sensitive, depending on the inhibition zone diameter (6 mm disc diameter included), as per manufacturers' label directions.

obtenida de American Type Culture Collection (ATCC).

Las pruebas de sensibilidad (tres repeticiones) a antibióticos de los aislamientos de *Staphylococcus* spp., se realizaron mediante el ensayo de difusión en disco en cajas de Petri con agar Mueller-Hinton (MH) (Bioxon). Las pruebas de susceptibilidad a QAC se realizaron, incorporando el detergente en cajas de Petri con agar MH. Para las pruebas de sensibilidad a antibióticos se utilizaron sensidiscos para bacterias Gram positivas (Bio-Rad). Se evaluaron 13 antibióticos: ampicilina, 10 µg; cefalotina, 30 µg; cefotaxima, 30 µg; ceftazidima, 30 µg; cefuroxima, 30 µg; dicloxacilina, 1 µg; eritromicina, 15 µg; gentamicina, 10 µg; pefloxacina, 5 µg; penicilina, 10 U; tetraciclina, 30 µg; trimetoprim, 25 µg, y lincomicina, 10 µg/ml (Pharmacia). Las bacterias se incubaron a 37 °C por 18 h y los aislamientos se clasificaron en resistentes, intermedios, moderadamente sensibles o sensibles, dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La evaluación de la susceptibilidad a QAC de los aislamientos de *Staphylococcus* se hizo cultivando las bacterias en cajas de Petri con agar MH que contenía concentraciones de 0.5 a 10 µg/ml del detergente QAC bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB, Sigma). Las bacterias se cultivaron a 37 °C por 24 h; el criterio de selección de la resistencia fue el crecimiento bacteriano a concentraciones superiores a 6 µg/ml del detergente⁽¹⁸⁾.

La extracción de ADN genómico de los aislamientos de *Staphylococcus* se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Pospiech y Neuman⁽²¹⁾. Las bacterias se cultivaron en 10 ml de medio líquido Luria-Bertani a 37 °C por 19 h. El paquete celular se colectó por centrifugación a 1,300 xg (rotor IEC 836) durante 10 min y se resuspendió en 5 ml de buffer SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7.5). Posteriormente, se adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó a 37 °C por 1 h. Se agregó 1/10 del volumen de SDS al 10% y se incubó a 55 °C con agitación ocasional durante 2 h. Se adicionó 1/3 del volumen

Staphylococcus isolate QAC susceptibility was assessed by culturing the bacteria on MH agar plates containing 0.5-10 µg/ml of the QAC detergent cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB, Sigma). Bacteria were cultured at 37 °C for 24 h. Resistance selection criterion was bacterial growth in the face of >6 µg/ml detergent concentrations⁽¹⁸⁾.

Staphylococcus genomic DNA extraction was performed using the Pospiech & Neuman's technique⁽²¹⁾. Bacteria were cultured in 10 ml Luria-Bertani's fluid medium at 37 °C for 19 h. Tubes were centrifuged at 1,300 xg (IEC 836 rotor) for 10 min. Cell pack was collected, then re-suspended in 5 ml SET buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7.5). Afterwards, lysozyme was added at a final concentration of 1 mg/ml, and then incubated at 37 °C for 1 h. One tenth (1/10) volume 10% SDS was added, and incubated at 55 °C with occasional stirring for 2 h. One third (1/3) volume 5 M NaCl and one full volume chloroform were then added. Cultures were incubated for 30 min at ambient temperature under frequent stirring. Tubes were centrifuged at 1,300 xg for 15 min, and the aqueous phase was transferred to new tubes. DNA was precipitated by the addition of one volume isopropanol. Finally, tubes were placed in ice for 5 minutes, and DNA was collected by centrifugation at 8,500 xg (IEC 836 rotor) for 10 min. Pellet was washed with 70% ethanol, then allowed to dry at ambient temperature. DNA was re-suspended in 200 µl de-ionized water, and identity was assured using 1% agarose gel electrophoresis.

DNA amplification profiles were established by detecting random polymorphism using the RAPD test. For this purpose, the ready-to-go RAPD reaction mix kit (Amersham Pharmacia Biotech) was used. Reaction mix components included: heat stable polymerase (AmplitaqTM DNA polymerase plus Stoffel fragment), dNTPs deoxynucleotides (0.4 mM each dNTP), bovine serum albumin (2.5 µg), and a buffer [3mM MgCl₂, 30 mM KCl, and 10 mM Tris, (pH 8.3)]. To this mix, 50 ng genomic DNA from each *Staphylococcus* isolate, and 25 picomoles oligonucleotide were added. Sterile, de-ionized water was added for an end volume of 25 µl. Lastly, 50 µl mineral oil were added. Each

de 5 M NaCl y un volumen de cloroformo. Luego se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación frecuente. Se centrifugaron los tubos a 1,300 xg durante 15 min y la fase acuosa se transfirió a tubos nuevos. El ADN se precipitó con la adición de un volumen de isopropanol. Finalmente, los tubos se colocaron durante 5 min en hielo y el ADN se colectó por centrifugación a 8,500 xg (rotor IEC 836) durante 10 min. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en un volumen de 200 μ l de agua desionizada y se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El establecimiento de los perfiles de amplificación de ADN se realizó mediante la detección de polimorfismos al azar por la técnica de RAPD's. Para la reacción de RAPD's se utilizó la mezcla de reacción "RAPD Analysis Kit (Ready to go)" de Amersham Pharmacia Biotech. Los componentes de la mezcla de reacción fueron: Polimerasa termoestable (Amplitaq™ ADN polimerasa y el fragmento Stoffel), desoxinucleótidos o dNTPs (0.4 mM de cada dNTP), seroalbúmina bovina (2.5 μ g) y amortiguador [3mM MgCl₂, 30 mM KCl y 10 mM Tris, (pH 8.3)]; a esta mezcla se le añadieron 50 ng de ADN genómico de cada aislamiento de *Staphylococcus* y 25 picomoles del oligonucleótido. Se agregó agua desionizada estéril para un volumen final de 25 μ l y por último, se adicionaron 50 μ l de aceite mineral. Los aislamientos de *Staphylococcus* se evaluaron por separado con cada uno de los oligonucleótidos y se efectuaron tres repeticiones del experimento. Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador Ericomp, con el programa siguiente: 45 ciclos de 94 °C por 1 min, 36 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Los seis oligonucleótidos al azar evaluados fueron: (1 {5'-d[GGTGCGGGAA]-3'}; 2 {(5'-d[GTTTCGCTCC]-3'}; 3 {5'-d[GTAGACCCGT]-3}; 4 {5'-d[AAGAGCCCGT]-3'}, 5 {5'-d[AACGCGCAAC]-3'}; 6 {5'-d[CCCGTCAGCA]-3'}). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en amortiguador de corrida TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Por cada 20 ml de agarosa se agregaron 5 μ l de bromuro

Staphylococcus isolate was evaluated separately with each oligonucleotide. Three (3) experiment repetitions were performed. For the amplification reactions, an Ericomp thermocycler was used under the following program: Forty five 94 °C for 1 min, 36 °C for 1 min, 72 °C for 1 min cycles. The six random oligonucleotides evaluated were: (1 {5'-d[GGTGCGGGAA]-3'}; 2 {(5'-d[GTTTCGCTCC]-3'}; 3 {5'-d[GTAGACCCGT]-3}; 4 {5'-d[AAGAGCCCGT]-3'}, 5 {5'-d[AACGCGCAAC]-3'}; 6 {5'-d[CCCGTCAGCA]-3'}). Amplification products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis in TBE (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). To each 20 ml agarose, 5 μ l 10 mg/ml ethidium bromide solution were added. After the electrophoresis at 80 V for 3 h, gels were visualized and entered into the EAGLE EYE II (Stratagene) photo-documentation system.

Amplification products were analyzed using the RFLPScan, version 2.1 (Scanalytics) software that allowed for the estimation of the molecular size of amplified fragments, as well as the similarity indexes/polymorphism among the different *Staphylococcus* spp. isolates.

In order to establish the similarity relationships among the *Staphylococcus* spp. isolates, the number and molecular size of amplification products were used to construct a binary [0,1] matrix, in which the presence [1] or absence [0] of one amplified fragment was coded. Data obtained by the RAPD technique is dominant, so that using the classic estimators of genetic diversity is not recommended⁽²²⁾. Because of this, the alternative was using a diversity measure based on Shannon's index⁽²³⁾, that determines the level of polymorphism in the frequency of amplified fragments, with the expression $H_o = 1 - \sum p_i \log_2 p_i$ where p_i is the frequency of amplified fragments. With this analysis, per-band genetic diversity values and total genetic diversity values were obtained using the Popgen software (24, available at: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>). From the data matrix obtained, a distance matrix among individuals was generated using the RAPDPLOT software⁽²⁵⁾. This allowed us to construct a phenogram, using the Phylip software⁽²⁶⁾. The phenogram was then edited/printed using the Treeview software⁽²⁷⁾.

de etidio de una solución de 10 mg/ml. Después de la electroforesis a 80 V por 3 h, los geles se visualizaron y capturaron en un sistema de foto documentación EAGLE EYE II (Stratagene).

Los productos de amplificación se analizaron con el programa RFLPScan versión 2.1 (Scanalytics). El análisis con este programa permitió estimar el tamaño molecular de los fragmentos amplificados, así como también los índices de similitud y polimorfismo entre los diferentes aislamientos de *Staphylococcus* spp.

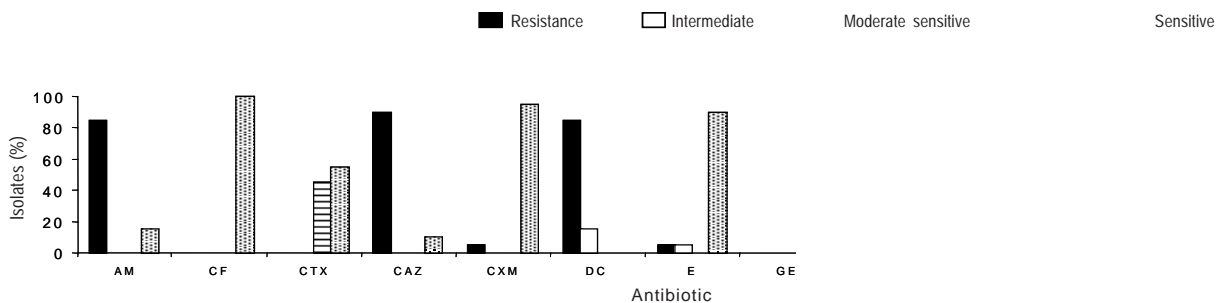
Para establecer las relaciones de similitud entre los aislamientos de *Staphylococcus* spp., con el número y tamaño molecular de los productos de amplificación se construyó una matriz binaria [0,1] en la que se codificó como 1 la presencia de un fragmento amplificado y 0 su ausencia. Los datos obtenidos por la técnica de RAPD son dominantes, por lo que no es recomendable usar los estimadores clásicos de diversidad genética⁽²²⁾. Debido a esto, la alternativa fue usar una medida de diversidad basada en el índice de Shannon⁽²³⁾, que determina el nivel de polimorfismo en la frecuencia de fragmentos amplificados con la expresión $H_o = 1 - \sum p_i \log_2 p_i$, donde p_i es la frecuencia de los fragmentos amplificados. Con este análisis se obtuvieron los valores de diversidad genética por banda y el valor de diversidad genética total, usando el programa Popgen⁽²⁴⁾. De la matriz de datos

A total of 20 isolates was obtained from Tarímbaro mastitic cow milk samples. Isolate genus was identified by both biochemistry tests and microscopic observation. All 20 isolates were Gram positive cocci. Likewise, hemolysis, catalase, coagulase, growth on mannitol-salt agar, and gelatinase yielded all positive results. These data aided in determining that the genus of all isolates was *Staphylococcus*. Isolates were arbitrarily designed as SA, followed by a number in agreement with each isolate collection data.

Antibiotic sensitivity tests were performed using antibiotic-impregnated discs specific for Gram positive bacteria. After incubation at 37 °C for 18 h, the inhibition zone was measured in order to determine the level of sensitivity. Results were as follows: 17 (85 %) isolates showed resistance to ampicillin. Only isolates SA2, SA7, and SA8 were sensitive to penicillin. Eighty five (85) percent isolates were resistant to both dicloxacillin and penicillin. Even though no isolates fully sensitive to dicloxacillin were found, three isolates showed intermediate sensitivity to this particular antibiotic. Ninety (90) percent isolates were resistant to ceftazidime. Only 5 % isolates showed resistance to cefuroxime and lincomycin (SA35), erythromycin (SA12), and tetracycline (SA8). All isolates were sensitive to cephalothin, gentamicin, and trimethoprim (Figure 1). Finally, with the exception

Figura 1. Pruebas de sensibilidad a antibióticos en los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de vacas lactantes con mastitis

Figure 1. Antibiotic sensitivity tests on 20 *Staphylococcus* spp. isolates from lactating cows



AM, ampicillin; CF, cephalothin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CXM, cefuroxime; DC, dicloxacillin; E, erythromycin; GE, gentamicin; PEF, pefloxacin; PE, penicillin; TE, tetracycline; SXT, trimethoprim; LIN, lincomycin.

obtenida se generó una matriz de distancia entre individuos con el programa RAPDPLOT⁽²⁵⁾, que permitió construir el fenograma usando el programa Phylip⁽²⁶⁾. La edición e impresión del fenograma se realizó con el programa Treeview⁽²⁷⁾.

Se obtuvieron un total de 20 aislamientos y la identificación del género de los aislamientos se realizó mediante pruebas bioquímicas y análisis al microscopio. Los 20 aislamientos presentaron la morfología celular de cocos y fueron positivos para la tinción de Gram. Además, las pruebas de hemólisis, catalasa, coagulasa, crecimiento en agar sal-manitol y gelatinasa realizadas a cada uno de los aislamientos resultaron positivas. Con estos datos se determinó que el género de los aislamientos fue *Staphylococcus*. Los aislamientos se denominaron arbitrariamente con las siglas SA y se les asignó un número de acuerdo con los datos de colecta.

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos se realizaron con sensibilizadores para bacterias Gram positivas impregnados con los antibióticos. Después de que las bacterias se incubaron a 37 °C por 18 h, se midió el halo de inhibición para determinar el grado de sensibilidad. Los resultados que se obtuvieron son los siguientes: 17 de los aislamientos mostraron resistencia a ampicilina (85 %) y sólo los aislamientos SA2, SA7 y SA8 fueron sensibles a este antibiótico. El 85 % de los aislamientos mostró resistencia a dicloxacilina y penicilina. En el caso de la dicloxacilina no se detectaron aislamientos sensibles; sin embargo, tres de ellos presentaron una sensibilidad intermedia. Por otro lado, el 90 % de los aislamientos fue resistente a ceftazidima. Sólo el 5% de los aislamientos mostró resistencia a cefuroxima/lincomicina (SA35), eritromicina (SA12) y tetraciclina (SA8). Todos los aislamientos mostraron sensibilidad a cefalotina, gentamicina y trimetoprim (Figura 1). Los aislamientos presentaron resistencias múltiples, particularmente hacia los antibióticos del grupo de las penicilinas, con excepción del aislamiento SA2 que fue resistente sólo a ceftazidima.

En la industria lechera se usan frecuentemente detergentes elaborados con compuestos cuaternarios de amonio como el CTAB y el cloruro de

of SA2 –that was resistant only to ceftazidime– all isolates showed multiple resistances, particularly to antibiotics of the penicillin class.

In the dairy industry, detergents prepared with quaternary ammonium compounds such as CTAB and benzalkonium chloride (Benzal), are frequently used to clean milking tools. The ability of *Staphylococcus* spp. to develop resistance to these detergents has been reported⁽¹⁷⁾. In order to explore whether any of the isolates was resistant to CTAB as a result of continued contact with this detergent, a susceptibility test was performed. Out of the 20 *Staphylococcus* spp. isolates, only isolates SA2, SA5, SA31, and SA37 grew in the presence of 0.5 µg/ml CTAB. This was also valid for the certified ATCC 27543 reference strain. Isolate SA11 grew in the presence of 3 µg/ml CTAB. Nevertheless, none of the isolates grew at a concentration >5 µg/ml CTAB. These results mean that all isolates are susceptible to CTAB.

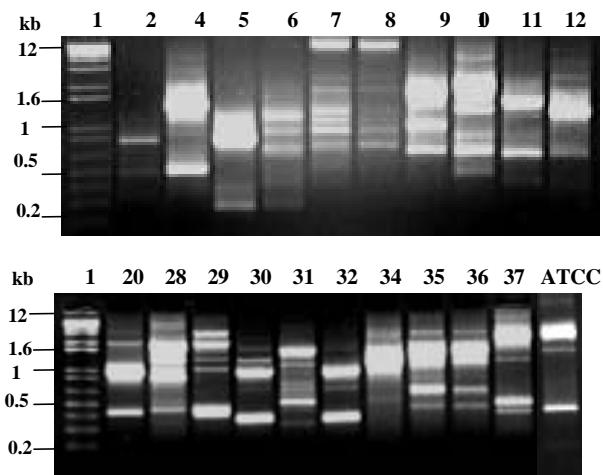
Staphylococcus spp. isolate DNA amplification profiles were obtained using the RAPD technique. In order to select the most adequate oligonucleotides, six of them were evaluated at random with one genomic DNA sample from the *S. aureus* ATCC 27543 strain. Selection criteria included the number of bands generated, and their molecular size, with an optimum amplification range of 0.2-2 kilobases (kb). In addition, a uniform distribution was considered within the range, together with the presence of discrete bands (data not shown). Oligonucleotides fulfilling these requirements were assigned numbers 1, 2, & 3 (see Materials and Methods). Genomic DNA samples from all 20 *Staphylococcus* spp. isolates and that from the ATCC 27543 reference strain were evaluated in three occasions with these 3 oligonucleotides, and the different electrophoretic profiles obtained were analyzed as described above in Materials and Methods. Results are shown as one individual of the 20 *Staphylococcus* spp. isolates, with regard to the ATCC 27543 reference strain, and as a comparison of amplification profiles among isolates.

Evaluation of the *Staphylococcus* spp. isolates with oligonucleotide 1 yielded amplifications with

benzalconio (Benzal), para la limpieza de los utensilios empleados en la ordeña. Algunos trabajos han reportado que las bacterias del género *Staphylococcus* son capaces de desarrollar resistencia hacia estos detergentes⁽¹⁷⁾. Para explorar si alguno de los aislamientos presentaba resistencia a CTAB, desarrollada por un contacto constante con este detergente, se procedió a evaluar su susceptibilidad. De los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp., y la cepa de referencia ATCC 27543 analizados, únicamente los aislamientos SA2, SA5, SA31, SA37 y la cepa certificada de referencia mostraron crecimiento a una concentración de 0.5 µg/ml de CTAB. El aislamiento SA11 creció a una concentración de 3 µg/ml de CTAB. Sin embargo, ningún aislamiento creció a una concentración mayor de 5 µg/ml de CTAB. Estos resultados indican que todos los aislamientos son susceptibles a CTAB.

Figura 2. Perfiles electroforéticos generados con la técnica de RAPD's utilizando el oligonucleótido 1 (5'-d[GGT GCGGAA]-3') para la evaluación en los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de vacas lactantes con mastitis

Figure 2. Electrophoretic profiles generated with the RAPD technique using oligonucleotide No. 1 (5'-d[GGTGC GGGAA]-3') for the evaluation of all 20 *Staphylococcus* spp. isolates obtained from mastitic lactating cows



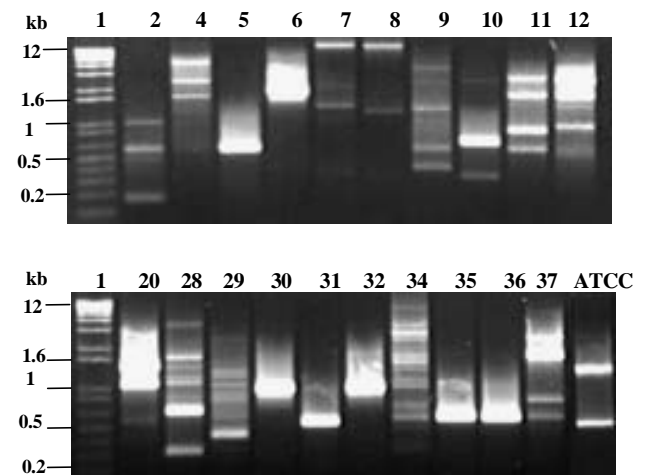
Lane 1) molecular size marker (1 kb, ladder, Gibco). Numbers on other lanes correspond to *Staphylococcus* isolates being evaluated.

molecular sizes within the 0.3-12 kb range (Figure 2). Isolates SA7 and SA8 shared 0.7, 0.85, 1, 1.2, 1.65, 2, and 12 kb bands, for 93.3 % similarity. Isolates SA30 and SA32 shared both 0.45 and 1 kb bands, for 85.7 % similarity. Likewise, the amplification patterns of SA35 and SA36 isolates shared 0.65, 1.3, and 1.65 kb bands for 85.7 % similarity. In comparison with ATCC 27543 reference strain, these isolates shared both 1.3 and 1.65 kb bands, for 50 % similarity. Nevertheless, they differed in 0.35 and 12 kb bands, which were only detected in the reference strain.

With oligonucleotide 2, amplifications within the 0.18-12 kb molecular size range were obtained (Figure 3). Isolates SA30 and SA32 showed to be similar, sharing a single 1 kb band. Isolates SA35 and SA36 shared one 0.55 kb band, for 100 %

Figura 3. Perfiles electroforéticos generados con la técnica de RAPD's utilizando el oligonucleótido 2 (5'-d[GTTT CGCTCC]-3') para la evaluación en los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de vacas lactantes con mastitis

Figure 3. Electrophoretic profiles generated with the RAPD technique using oligonucleotide No. 2 (5'-d[GTTT CGCTCC]-3') for the evaluation of all 20 *Staphylococcus* spp. isolates from mastitic lactating cows



Lane 1) molecular size marker (1 kb, ladder, Gibco). Numbers on other lanes correspond to *Staphylococcus* isolates being evaluated.

Los perfiles de amplificación de ADN en los aislamientos de *Staphylococcus* se obtuvieron mediante la técnica de RAPD's. Para seleccionar los oligonucleótidos más adecuados, se evaluaron seis diseñados al azar con una muestra del ADN genómico de la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 27543. Los criterios de selección incluyeron el número de bandas generadas y el tamaño molecular de las mismas, con un rango de amplificación óptimo entre 0.2 y 2 kilobases (kb). Además, se consideró una distribución uniforme dentro del rango y la presencia de bandas discretas (datos no mostrados). Los oligonucleótidos que cumplieron con estos requisitos son los identificados con los números 1, 2 y 3 (ver materiales y métodos). Las muestras de ADN genómico de los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp., y la cepa de referencia ATCC 27543 se evaluaron en tres ocasiones con estos tres oligonucleótidos, y los diferentes perfiles electroforéticos obtenidos se analizaron como se describe en materiales y métodos. Los resultados se presentan como un análisis individual de los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp., con respecto a la cepa de referencia ATCC 27543, y como una comparación de los perfiles de amplificación entre los aislamientos.

La evaluación de los aislamientos de *Staphylococcus* spp., con el oligonucleótido 1 generó amplificaciones con tamaños moleculares dentro del rango de 0.3 a 12 kb (Figura 2). Los aislamientos SA7 y SA8 compartieron las bandas de 0.7, 0.85, 1, 1.2, 1.65, 2 y 12 kb, por lo que presentaron una similitud del 93.3 %. Los aislamientos SA30 y SA32 compartieron las bandas de 0.45 y 1 kb, con una similitud del 85.7 %. El patrón de amplificación de los aislamientos SA35 y SA36 mostró también una similitud del 85.7 %, compartiendo las bandas de 0.65, 1.3 y 1.65 kb. Estos mismos aislamientos tuvieron una similitud del 50 % con respecto a la cepa de referencia ATCC 27543, al compartir las bandas de 1.3 y 1.65 kb; sin embargo, fueron diferentes en las bandas de 0.35 y 12 kb, las cuales se detectaron sólo en la cepa de referencia.

Con el oligonucleótido 2 se obtuvieron amplificados con un rango de tamaño molecular entre 0.18 y 12 kb (Figura 3). Se observó que los aislamientos

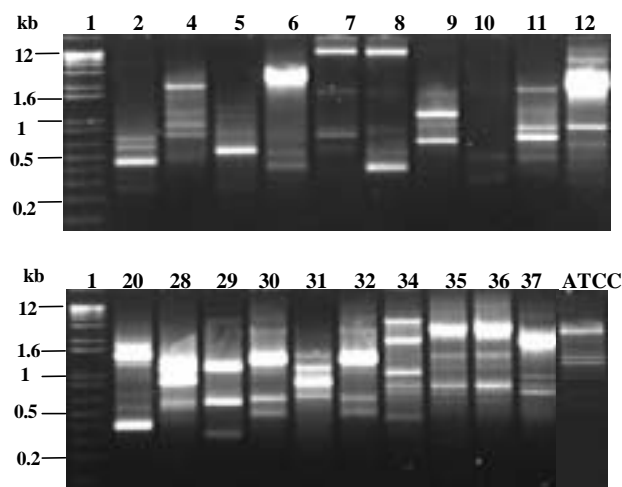
similarity. Isolates SA7 and SA8 shared both 0.4 and 12 kb bands, for 50 % similarity. All other isolates had dissimilar amplification patterns.

Amplification profiles generated with oligonucleotide 3 showed sizes within the 0.2-12 kb range (Figure 4). Isolates SA7 and SA8 shared 0.6, 2, and 12 kb bands, for a 72.7 % similarity index. Isolates SA30 and SA32 shared all 0.5, 0.65, 1.2, 1.5, 2.5, and 4 kb bands, for 100 similarity. Isolates SA35 and SA36 shared 0.65, 0.8, 0.85, 1.3, 1.5, 2.7 kb bands, for 94.1% similarity.

In order to establish similarity indexes among all 20 *Staphylococcus* spp. isolates, a binary matrix was prepared with the information from the amplification products, plus the estimated molecular size. Per-band genetic diversity and total genetic

Figura 4. Perfiles electroforéticos generados con la técnica de RAPD's utilizando el oligonucleótido 3 (5'-d[GTAGA CCCGT]-3') para la evaluación en los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de vacas lactantes con mastitis

Figure 4. Electrophoretic profiles generated with the RAPD technique using oligonucleotide No. 3 (5'-d[GTAGA CCCGT]-3') for the evaluation of all 20 *Staphylococcus* spp. isolates obtained from mastitic lactating cows



Lane 1) molecular size marker (1 kb, ladder, Gibco). Numbers on other lines correspond to *Staphylococcus* isolates being evaluated.

SA30 y SA32 fueron similares, con sólo una banda de 1 kb. Los aislamientos SA35 y SA36 presentaron una similitud del 100 %, al compartir una banda de 0.55 kb. Los aislamientos SA7 y SA8 compartieron las bandas de 0.4 y 12 kb, por lo que se obtuvo un 50% de similitud. Los demás aislamientos poseen patrones de amplificación distintos.

Los perfiles de amplificación generados con el oligonucleótido 3 tuvieron tamaños dentro del rango de 0.2 kb a 12 kb (Figura 4). Se observó que los aislamientos SA7 y SA8 compartieron las bandas de 0.6, 2 y 12 kb, y el índice de similitud fue del 72.7%. La similitud de los aislamientos SA30 y SA32 fue del 100 %, compartiendo las bandas de 0.5, 0.65, 1.2, 1.5, 2.5, y 4 kb. Para los aislamientos SA35 y SA36 se obtuvo una similitud del 94.1 %, compartiendo bandas de 0.65, 0.8, 0.85, 1.3, 1.5, 2.7 kb.

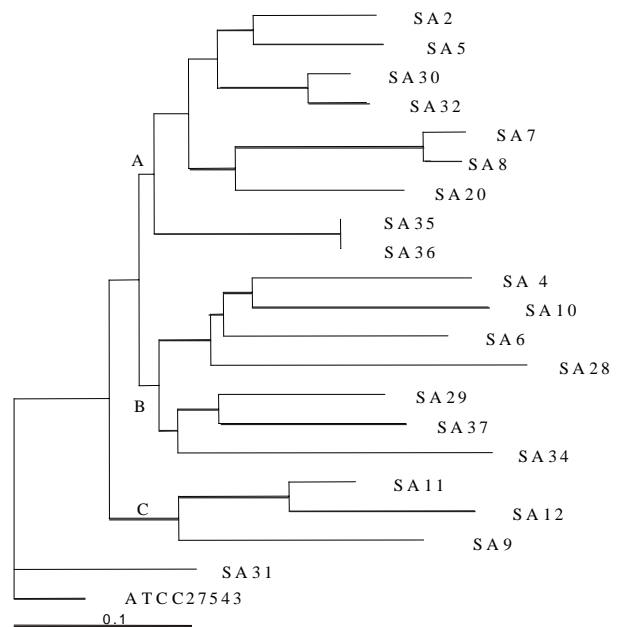
Para establecer las relaciones de similitud entre los 20 aislamientos de *Staphylococcus* spp., se elaboró una matriz binaria con la información de los productos de amplificación y la estimación de los tamaños moleculares. Se obtuvieron los valores de diversidad genética por banda y el valor de diversidad genética total con el programa Popgen. De la matriz de datos obtenida se generó una matriz de distancia entre los individuos con el programa RAPD PLOT y se elaboró el fenograma que se presenta en la Figura 5. En éste se observa la formación de tres grupos denominados A, B y C. Dentro del grupo A, los aislamientos SA30 y SA32 son muy similares, así como los aislamientos SA35 y SA36 constituyen una rama única en el fenograma y son idénticos. En los grupos B y C no se observaron relaciones de similitud estrechas que permitieran suponer la presencia de reaislamientos, lo cual se correlaciona con las diferencias que mostraron en los perfiles de amplificación de ADN. El aislamiento SA31 fue el único que no se pudo incluir en alguno de los tres grupos. Todos los aislamientos son diferentes a la cepa de referencia ATCC 27543.

Las pruebas bioquímicas y el análisis al microscopio son herramientas útiles para identificar cepas

diversity values were obtained using the Popgen software. From the data matrix obtained, a distance among individuals matrix was generated using the RAPD PLOT software, and the phenogram shown in Figure 5 was prepared. The phenogram shows that 3 groups (A, B, and C) were formed. Within group A, isolates SA30 and SA32 are very similar. This is also valid for isolates SA35 and SA36 that constitute one single branch in the phenogram, and they are identical. No close similarity relationships were found in groups B and C that might suggest re-isolations. This is correlated with the differences observed among DNA amplification profiles. Isolate SA31 was the only isolate that could not be included in any of these 3 groups. All isolates were different from the ATCC 27543 reference strain.

Figura 5. Fenograma que presenta las relaciones de similitud entre la cepa certificada ATCC 27543 y los 20 aislamientos de *Staphylococcus* obtenidos de vacas lactantes con mastitis

Figure 5. Phenogram showing similarity relationships between the certified ATCC 27543 strain and all 20 *Staphylococcus* isolates obtained from mastitic, lactating cows



Scale on bottom represents the calculated similarity value, using the algorithm developed by Black (17). A, B, and C, represent the resulting groups.

pertenecientes al género *Staphylococcus*. Sin embargo, no es posible detectar variabilidad genética entre los aislamientos que permita establecer una diferenciación molecular entre ellos. Por tal razón, en este trabajo se demuestra que los aislamientos de *Staphylococcus*, colectados de vacas con mastitis del municipio de Tarímbaro, Michoacán y evaluadas mediante la técnica de RAPD, presentan entre ellos un alto porcentaje de polimorfismo. Además, todos los aislamientos resultaron diferentes en su perfil de bandas obtenida por RAPD con respecto a la cepa certificada de *S. aureus* (ATCC 27543).

El uso de antimicrobianos es una herramienta útil para el control de la mastitis causada por *Staphylococcus*. Las pruebas de susceptibilidad a este tipo de compuestos son una guía importante, usada por el veterinario al momento de seleccionar el tratamiento más adecuado para el control de la enfermedad⁽²⁸⁾. No obstante, en México y particularmente en la región lechera de Tarímbaro, Michoacán, la información con la que se cuenta al respecto es poca o inexistente. Las pruebas de sensibilidad a antibióticos realizada a los 20 aislamientos de *Staphylococcus* demuestran que existen diversas resistencias, destacando aquéllas mostradas hacia antibióticos del grupo de las penicilinas como la ampicilina, ceftazidima y dicloxacilina (Figura 1). Esto significa probablemente que en la región evaluada se han utilizado con frecuencia antibióticos del grupo de las penicilinas para el control de las infecciones, lo cual ha expuesto a las bacterias a una presión de selección alta que ha conducido al desarrollo de la resistencia. No obstante, los aislamientos poseen una alta sensibilidad a antibióticos como la eritromicina (macrólido), la lincomicina (lincosamida) y la cefalotina. La evaluación detallada de la sensibilidad a antibióticos pertenecientes a familias distintas es importante porque proporciona la información básica que conduce posteriormente a la identificación y caracterización del gen o grupo de genes que confieren resistencia a un tipo particular de antibiótico. En este sentido, se ha determinado que el gen *linA* responsable de la resistencia a lincomicina del aislamiento SA35 se ubica en el plásmido pBMSa1, del cual se obtuvo su secuencia de nucleótidos completa, se comparó

Both biochemical tests and microscopic observation are tools useful to identify strains belonging to the *Staphylococcus* genus. Nevertheless, these techniques do not allow for the detection of genetic variability that could lead to the establishment of molecular differentiation among strains. Therefore, this research shows that the *Staphylococcus* spp. isolates from Tarímbaro mastitic cows, evaluated using the RAPD technique, show a high level of polymorphism. In addition, all isolates show different RAPD band profiles, when compared with the *S. aureus* (ATCC 27543) reference strain.

Antimicrobials are useful tools in the control of *Staphylococcus*-caused mastitis. Antimicrobial sensitivity tests are an important guideline used by veterinarians when selecting the most adequate treatment for the control of mastitis⁽²⁸⁾. Nevertheless, in Mexico, particularly in the Tarímbaro dairy region, little or no information exists on this matter. Sensitivity tests performed with the 20 *Staphylococcus* isolates show resistance to several drugs, particularly to the penicillin class of antibiotics such as ampicillin, ceftazidime, and dicloxacillin (Figure 1), probably meaning that in this region penicillin class antibiotics have been frequently used for the control of these infections, therefore exerting high selection pressure on the bacteria, and resulting in the development of resistance. Nevertheless, isolates show high sensitivity levels to antibiotics, such as erythromycin (a macrolide), lincomycin (a lincosamide), and cephalothin. A detailed evaluation of sensitivity to antibiotics of different classes is important in order to obtain basic information leading to the identification and characterization of the gene or gene pools that confer resistance to one particular antibiotic class. In this trend, it has been determined that gene *linA*, responsible for lincomycin resistance in isolate SA35, is located in plasmid pBMSa1, of which the full nucleotide sequence has been obtained and compared. Also, each of its regions has been analyzed (GenBank access number: AY541446)⁽²⁹⁾.

On the other hand, the dairy industry commonly uses quaternary ammonium-based detergents, such as CTAB and benzalkonium chloride, to clean and wash dairy equipment. This has made bacteria of

y analizó cada una de sus regiones (No. de acceso en GenBank: AY541446)⁽²⁹⁾.

Por otro lado, en la industria lechera es común el uso de detergentes elaborados con compuestos cuaternarios de amonio como el CTAB y el cloruro de benzalconio, para la limpieza y lavado de los utensilios. Esto ha provocado que las bacterias del género *Staphylococcus* hayan desarrollado resistencia hacia estos detergentes⁽¹⁷⁾. Las pruebas de susceptibilidad realizadas a los 20 aislamientos de *Staphylococcus* mostraron que todos ellos son susceptibles a concentraciones superiores a 3 µg/ml del detergente, con lo cual se considera que no se ha desarrollado resistencia. Es probable que esto se deba a que los aislamientos provienen de establos de traspatio, en donde es mínimo el uso de detergentes y por lo tanto, las bacterias no han desarrollado resistencia a estos.

Varios métodos moleculares han mostrado ser confiables para la diferenciación y tipificación de cepas de *S. aureus* aisladas de secreciones de la glándula mamaria de bovinos^(4,5,30,31). Por ejemplo, en un análisis de tipificación de aislamientos, estableciendo la huella genética por PCR, se identificaron 19 perfiles distintos de *S. aureus*, de los cuales el 52 % perteneció sólo a dos subtipos de zonas geográficas diferentes⁽³⁰⁾. Por otro lado, en un estudio de 63 aislamientos de *S. aureus* colectados de cinco hatos se encontraron diferentes patrones moleculares, estableciendo la huella genética por PCR⁽³¹⁾. El análisis de 40 aislamientos de *S. aureus* de 10 hatos lecheros, aplicando las técnicas de RAPD, ribotipificación y biotipificación, resultó en la agrupación de seis perfiles diferentes⁽⁵⁾. En una tipificación de 71 aislamientos de *S. aureus* de muestras de leche colectadas de un solo hato lechero, empleando las técnicas de RAPD y tipificación de fagos, se demostró que el 93 % de las cepas podían ser agrupadas en un genotipo único⁽⁴⁾. En estos dos últimos trabajos, los autores demostraron una coincidencia del 100 % entre los patrones obtenidos por la técnica sencilla de RAPD y las de ribotipificación y tipificación de fagos, validando con ello la aplicación del RAPD para caracterizar molecularmente las cepas de *S. aureus*.

the *Staphylococcus* genus to develop resistance to such detergents⁽¹⁷⁾. Susceptibility tests performed on all 20 *Staphylococcus* isolates showed that they are all susceptible at concentrations >3 µg/ml detergent. Therefore, it is considered that no resistance has been developed, probably due to the fact that these isolates were collected from backyard dairies, where detergents are seldom used. Therefore, no bacterial resistance has been developed.

Several molecular methods have shown to be reliable for the differentiation/typing of *S. aureus* strains isolated from bovine mammary secretions^(4,5,30,31). For example, an isolate typing analysis that established the PCR genetic fingerprint, identified 19 different *S. aureus* profiles, out of which 52 % corresponded to only two subtypes from different geographic zones⁽³⁰⁾. On the other hand, one study of 63 *S. aureus* isolates collected from five herds, found different molecular patterns in accordance with their PCR genetic fingerprint⁽³¹⁾. The analysis of 40 *S. aureus* isolates from 10 dairy herds using RAPD, ribotyping and biotyping techniques, resulted in six different profile groups⁽⁵⁾. A study in which 71 *S. aureus* isolates from milk samples collected in one single dairy herd were typed using both RAPD and phage typing, showed that 93 % strains could be grouped within one single genotype⁽⁴⁾. In these two last papers, the authors showed a 100 % coincidence between the patterns obtained by the simple RAPD technique, and those obtained by ribotyping and phage typing, therefore validating the application of RAPD for the molecular characterization of *S. aureus* strains.

It is worthy to mention that RAPD-derived data is dominant, so that using the classic genetic diversity estimators is not recommended⁽²²⁾. Because of this, the Shannon's index⁽²³⁾ was used in this study to establish similarity relationships among *Staphylococcus* spp. isolates. Despite that most isolates showed different amplification patterns, it was possible to integrate three groups (Figure 5). *Staphylococcus* isolate DNA amplification profiles allowed us to determine high polymorphism percentage, sometimes in excess to 30 %. This value is considered as high, given that all isolates

Es importante mencionar que los datos obtenidos por la técnica de RAPD son dominantes, por lo tanto no es recomendable usar los estimadores clásicos de diversidad genética⁽²²⁾. Ante esta situación, en este estudio se utilizó el índice de Shannon⁽²³⁾ para establecer las relaciones de similitud entre los aislamientos de *Staphylococcus* spp. A pesar de que la mayoría de los aislamientos mostraron diferentes patrones de amplificación, fue posible establecer la formación de tres grupos (Figura 5). Los perfiles de amplificación de ADN de los aislamientos de *Staphylococcus* permitió determinar un alto porcentaje de polimorfismo, en algunos casos superiores al 30 %; este valor es considerado alto si se toma en cuenta que los aislamientos provienen de una sola región. Sin embargo, se observó que dentro del grupo A los aislamientos SA7 y SA8 presentan una similitud superior al 90 %. De la misma manera, los aislamientos SA30 y SA32 poseen un índice de similitud mayor del 90 %. Los aislamientos SA35 y SA36 mostraron una similitud del 100 %, pero no poseen el mismo perfil de resistencias.

El polimorfismo genético observado entre los aislamientos de *Staphylococcus* spp., podría deberse en parte a que los aislamientos están constantemente sometidos a diversos factores de presión selectiva, por ejemplo, el uso continuo de antibióticos para combatir la infección, y sugiere que diversas especies y ningún reaislamiento, fueron obtenidas. Aunado a lo anterior, se debe considerar la transferencia horizontal de genes entre las bacterias, la cual ocurre principalmente por medio de eventos de transformación, conjugación y competencia. La caracterización definitiva de especie está en curso en el laboratorio.

La caracterización molecular realizada en este trabajo demostró que existe polimorfismo genético en los aislamientos de *Staphylococcus* spp., de una sola región lechera. Asimismo, las pruebas de sensibilidad a antibióticos de los aislamientos de *Staphylococcus* spp., mostraron que poseen resistencias hacia los antibióticos del grupo de las penicilinas, aunque fueron sensibles a macrólidos y lincosamidas. Por otro lado, mostraron susceptibilidad a compuestos cuaternarios de amonio

were collected from one same region. Nevertheless, it was noticed that within group A, isolates SA7 and SA8 had >90% similarity. Likewise, isolates SA30 and SA32 had a similarity index in excess of 90 %. Isolates SA35 and SA36 showed 100 % similarity, even though they do not share a common resistance profile.

The genetic polymorphism observed among *Staphylococcus* spp. isolates could be partly due to the fact that isolates are constantly subjected to different selective pressure factors, such as the continued use of antibiotics to combat infections. This suggests that several species and no re-isolations were obtained. In addition to the above, horizontal gene transfer among bacteria must be considered, which occurs mainly through transformation, conjugation, and competition events. Definite species characterization is currently in course in our laboratory.

The molecular characterization performed in this research showed the presence of genetic polymorphism among *Staphylococcus* spp. isolates from one single dairy region. Similarly, *Staphylococcus* spp. isolate antibiotic sensitivity tests showed resistance to penicillin class antibiotics, but sensitivity to both macrolides and lincosamides was found. On the other hand, the isolates were susceptible to quaternary ammonium compounds such as CTAB, which are used in the manufacturing of detergents commonly used in intensive dairy operations.

Antimicrobial resistance information and genetic diversity data should be considered as a part of an all-inclusive dairy herd management strategy, if success is going to be obtained in the control of bovine mastitis. This type of evaluations should be performed in different dairy regions, since resistance patterns and isolate diversity vary on a per-region basis. In addition, the systematic molecular study of a larger number of isolates, and their correlation at a species level will further allow for obtaining precise information in order to establish correlations with antibiotic resistance and detergent susceptibility. From these correlations, the different *Staphylococcus* spp. isolates can be grouped up in well defined

como el CTAB, los cuales son utilizados para elaborar detergentes de uso común en los sistemas de producción lechera intensiva.

Los datos de resistencias hacia antimicrobianos y los de diversidad genética deben ser considerados como parte de una estrategia integral de manejo de los hatos lecheros si se quiere tener éxito en el control de la mastitis bovina. Es necesario realizar este tipo de evaluaciones en las diferentes regiones lecheras, ya que los patrones de resistencia y la diversidad de los aislados es propia de cada región. Además, el estudio sistemático molecular de un mayor número de aislamientos y su correlación con la identificación a nivel de especie permitirá, en un futuro, tener la información precisa para establecer correlaciones con la resistencia a antibióticos y la susceptibilidad a detergentes. De esta correlación se podrán agrupar a los diferentes aislados de *Staphylococcus* spp., en familias bien definidas, lo cual aportará una perspectiva clara para estructurar una estrategia de control de la mastitis bovina ocasionada por patógenos del género *Staphylococcus*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo técnico de MVZ Morelia Soto Huipe, QFB Irma Rentería Solórzano y QFB Rosalva Mejía Alfaro. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con los proyectos CIC14.4/2004 y CIC14.5/2004 asignados a VMBA y JELM, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- Hortet P, Seegers H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Review Prev Vet Med* 1998;37:1-20.
- Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 1988;16:41-66.
- Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Glickman A, Krufucks O, Ezra E, Saran A. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. *J Vet Med B* 1999;46:707-712.
- Lipman LJ, de Nijs A, Lamb TJ, van Dijk L, Schukken YK, Gastar W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains,

families, in order to obtain a clear perspective, as the basis of a bovine mastitis control strategy, when caused by pathogens of the *Staphylococcus* genus.

ACKNOWLEDGEMENTS

Gratitude is expressed for the technical support of Morelia Soto Huipe, DVM, Irma Rentería Solórzano, QFB* and Rosalva Mejía Alfaro, QFB*. This research was financially supported by Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, projects CIC14.4/2004 and CIC14.5/2004 assigned to VMBA and JELM, respectively.

End of english version

-
- isolated from mammary glands of cows. *Vet Microbiol* 1996;48:51-55.
 - Myllis V, Rideell J, Bjorkroth J, Biese I, Pyorala S. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet Microbiol* 1997;57(2-3):245-251.
 - Fitzgerald JR, Hartigan PJ, Meaney WJ, Smith CJ. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *Vet Microbiol* 2000;88:1028-1037.
 - Pereira MS, Leal NC, Leal TC, Sobreira M, de Almeida AM, Siqueira-Junior JP, Campos-Takaki GM. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2002;35:32-36.
 - Infante-Martínez F, Flores-Gutiérrez GH, Lozoya-Chávez J. Identificación de *Mycoplasma* spp en leche bovina con prueba de inmunoperoxidasa. *Rev Lat Microbiol* 2004;35:101-107.
 - Manzano CC, Salguero LG, López BB, Soto CR. Resultados del empleo de una bacterina contra *Staphylococcus aureus* en un brote de mastitis en un establo del CAIT. *Memorias del XXVIII Congreso nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán. 2004.*
 - Morales C, Huerta G. Bacterias asociadas con mastitis bovina y su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos. *XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán. 2004.*
 - Luna CS, Segundo ZC. Aislamiento e identificación de levaduras aisladas de leche de vacas con mastitis crónica. *XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán. 2004.*
 - Reséndiz MR, Villaroel EOA, Trejo NS, García VS. Diagnóstico de la mastitis subclínica en bovinos lecheros del municipio de Tochtepec, Estado de Puebla. *XXVI Congreso nacional de Buiatría. Acapulco, Guerrero. 2002.*
 - Bolaños LDJ, Muñoz MCR, Medina DR, Iñiguez MG, Córdoba I. Influencia de la mastitis subclínica bovina sobre la producción de leche en un hato lechero de Tulancingo, Hidalgo. *XXVIII Congreso nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán. 2004.*

14. Firth N, Skurray SA. The *Staphylococcus*—genetics: accessory elements and genetic exchange. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI editors. Gram-positive pathogens. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2000:326–338.
15. Novick RP. Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu Rev Microbiol* 1989;43:537–565.
16. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003;302:1569–1571.
17. Littlejohn TG, Paulsen IT, Gillespie MT, Tennent JM, Midgley M, Jones IG, et al. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;95:259–266.
18. Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(10):3046–3052.
19. Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1997;24:574–579.
20. Avila TS. Estado actual de la ganadería bovina, comercialización, consumo e importancia de productos lácteos en México. En: Situación actual y perspectivas de la producción de leche de ganado bovino en México 1990-2000. Centro de Estadística Agropecuaria (CEA), Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 2000.
21. Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet* 1995;11:217–218.
22. Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York, USA: Columbia University Press; 1987.
23. Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press; 1949.
24. Yeh FC, Yang R. POPGEN Version 1.31. University of Alberta. Alberta, Canada; 1999.
25. Black IV WC. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Ft. Collins, CO; 1995.
26. Felsenstein J. Phylogeny inference package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle, USA; 1993.
27. Page RD. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 1996;12:357–358.
28. Watts JL, Nickerson SC, Weaver LJ, Holmberg C, Pankey JW, Fox LK. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary gland of dairy heifers. *J Dairy Sci* 1995;78:1637–1648.
29. Loeza-Lara PD, Soto-Huipé M, Baizabal-Aguirre VM, Ochoa-Zarzosa A, Valdez-Alarcón JJ, Cano-Camacho H, López-Meza JE. pBMSa1 a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus* encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling circle mechanism. *Plasmid* 2004;52(1):48–56.
30. Matthews KR, Kumar SJ, O’Conner SA, Harmon RJ, Pankey JW, Fox LK, Oliver SP. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. *Epidemiol Infect* 1994;112:177–186.
31. Lam TJ, Lipman LA, Schukken YH, Gaastra W, Brand A. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am J Vet Res* 1996;57:39–42.