

Estructura genética de la población de *Staphylococcus aureus* asociada a mastitis bovina en granjas familiares de Tarímbaro, Michoacán, mediante análisis de secuencias multilocus (Multilocus sequence typing; MLST)

Daniela Angel-Andrés¹, José Luis Solorio-Rivera², Víctor Manuel Baizabal-Aguirre¹, Alejandro Bravo-Patiño¹, Marcos Cajero-Juárez^{1,3}, Laura Guadalupe Sánchez-Gil², Martha Patricia Chávez-Moctezuma⁴, Juan José Valdez-Alarcón¹✉

¹Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Campus Tarímbaro, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma. C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán, México.

²Unidad de Servicios de Apoyo al Diagnóstico, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Campus Tarímbaro, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma. C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán, México.

³Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Campus Tarímbaro, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma. C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán, México.

⁴Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B-1, planta baja, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México

Resumen

La mastitis bovina en sus formas clínica y subclínica representan uno de los mayores problemas de la industria lechera. En este trabajo se realizó el análisis de la estructura genética de la población de *S. aureus* asociado a mastitis bovina en tres regiones geográficas representadas por los municipios de Tarímbaro en Michoacán, Yuriria en Guanajuato y Toluca en el Estado de México. Se utilizó el análisis de secuencias multilocus (MLST) de los aislados para establecer las relaciones filogenéticas y de dispersión genética de la población. Se encontraron dos linajes genéticos prevalentes, asociados al Complejo Clonal (CC) 97 y al CC126. También se encontraron genotipos con Secuencia-Tipo (ST) 8 en bovinos, cuando este genotipo se ha descrito para clonas pandémicas de infecciones adquiridas en la comunidad. Además la presencia de genotipos típicos de bovino en humanos y de genotipos típicos de humano en bovinos sugieren el potencial zoonótico de los mismos.

Introducción

La mastitis bovina, inflamación de la glándula mamaria, en su forma clínica o subclínica, es una de las enfermedades que causa mayores pérdidas económicas a la industria lechera ya sea por la disminución en la producción de leche o bien por cambios en la calidad de ésta. *S. aureus* es uno de los principales agentes contagiosos causantes de mastitis. También es agente etiológico de infecciones de la piel, condronecrosis aviar, artritis séptica, entre otras afecciones (Plozza *et al.*, 2011; Lowder *et al.*, 2009). En humanos, *S. aureus* es un residente persistente de la nariz en 20% de la población sana y en portadores intermitentes en un 60% (Apolonio *et al.*, 2011; Hamdan- Partida *et al.*, 2010; Kluytmans *et al.*, 1997). Los portadores nasales han sido identificados como un factor de riesgo en la patogénesis de infecciones por *S. aureus* adquiridas en la comunidad (AC) y nosocomiales o adquiridos en hospitales (AH) (Bae *et al.*, 2010). En México, Apolonio *et al.*, (2011) identificaron cepas de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (SARM) en pacientes dentales sanos, y Velázquez-Meza *et al.*, (2011) reportaron la presencia de la primer aislamiento de *S. aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad (SARM-AC) con un genotipo asociado a la clona pandémica USA 300. Las

patologías más comunes en humanos son dermatitis, infecciones respiratorias y del tracto urinario, endocarditis infecciosa, osteomielitis, bacteremias e intoxicaciones alimentarias, todas de alta morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados (Amorim *et al.*, 2007; Dixon, 1995; Enright *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 1992; Zadoks *et al.*, 2000). El primer aislado de SARM de una fuente no humana, fue de leche de vaca. Subsecuentemente, cepas SARM se han reportado en una amplia variedad de animales domésticos incluyendo perros, gatos, cabras, ovejas, conejos, caballos, cerdos y gallinas (Leonard y Markey, 2008; Lindsay, 2008; Smyth *et al.*, 2007; Smyth *et al.*, 2009).

S. aureus puede identificarse por métodos fenotípicos que incluyen la morfología colonial en medios selectivos y diferenciales, pruebas bioquímicas, pruebas de coagulasa y hemólisis, patrón de susceptibilidad a antibióticos, susceptibilidad a fagos y producción de toxinas. En nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado que el uso de agar sal y manitol como medio de aislamiento primario en combinación con pruebas secundarias como determinación de las actividades de coagulasa y hemólisis, son una combinación con alta sensibilidad y especificidad para identificar a *S. aureus* de origen bovino (Bautista-Trujillo *et al.*, 2013). Sin embargo, esta identificación no es suficiente para establecer estudios epidemiológicos detallados y estrategias de control dirigidas. Las cepas de *S. aureus* causantes de diversas patologías se caracterizan con métodos moleculares que incluyen, principalmente, la macrorestricción del genoma en electroforesis

✉ Autor de correspondencia: J.J. Valdez Alarcón. Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro Campus Tarímbaro, La Palma. C.P. 58893, Tarímbaro, Michoacán, México. Email: jvaldez_a@hotmail.com; jvaldez@umich.mx Tel/Fax: +52(443)295-8029.

de campos pulsados (PFGE), caracterización mediante análisis de secuencias multilocus (multilocus sequence typing; MLST), caracterización del Cassete Cromosómico Estafilocócico de resistencia a meticilina (SCC*mec*-typing) y caracterización de la región de repetidos simples de secuencias del gen de la Proteína A (*spa*) de *S. aureus* (*spa*-typing; Leonard y Markey, 2008), entre otros. Estos métodos difieren en el tipo de polimorfismos genéticos que se analizan y en su capacidad discriminatoria. Mientras que PFGE analiza el patrón de restricción del genoma en su totalidad, MLST y *spa*-typing se basan en el análisis de secuencias, de genes bajo poca (MLST) o alta (*spa*-typing) presión de selección. PFGE es el método con mayor poder discriminatorio seguido de *spa*-typing y MLST (Valdez-Alarcón et al., 2012). MLST es un método de uso universal, portátil y definitivo para la tipificación de bacterias. Consiste en identificar la variación alélica de siete genes de metabolismo primario (Maiden, 2006). Fragmentos de aproximadamente 450 pb de cada uno de los 7 genes son secuenciados y comparados con alelos conocidos en la base de datos alojada en el sitio oficial de MLST (<http://www.mlst.net>) para obtener la combinación de alelos o perfil alélico de cada cepa. A cada perfil alélico se le asigna un código denominado Secuencia-Tipo (ST) la cual las distingue. Las diferentes STs se agrupan de acuerdo al número de alelos que comparten para establecer grupos de similitud llamados Complejos Clonales, en los que las ST relacionadas varían en uno o más alelos (Ilustración 1). Por analizar la variación alélica de genes del metabolismo primario, sujetos a baja presión de selección, MLST permite analizar la historia evolutiva de la especie microbiana, independientemente de su asociación a los diferentes tipos de patología descritas anteriormente. Adicionalmente las bases de datos en mlst.

net proporcionan información epidemiológica asociada a STs específicos, facilitando un análisis epidemiológico global, es decir, comparar los fondos genéticos obtenidos localmente con los reportados de manera global en la base de datos.

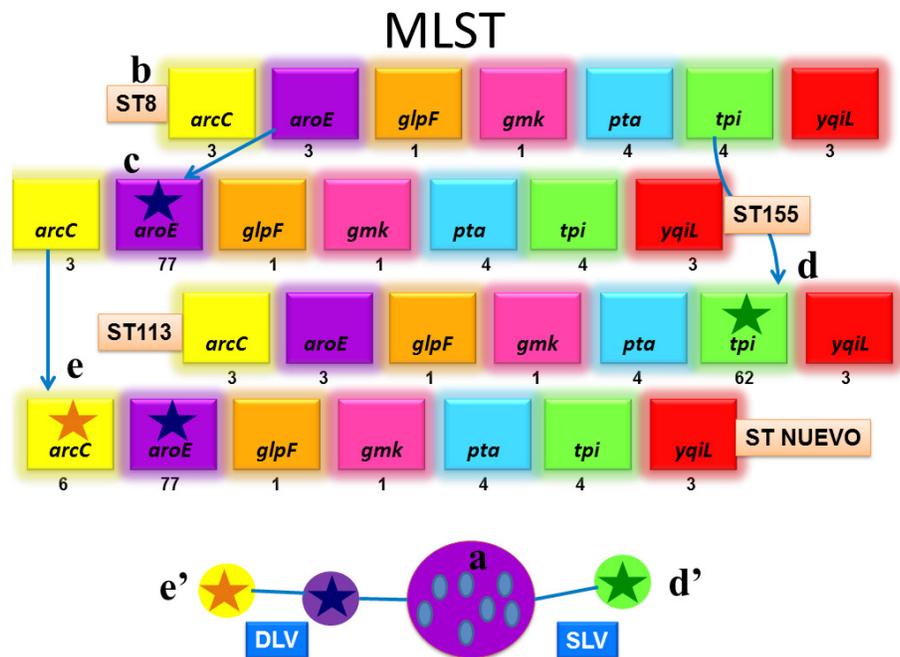
Existen cinco linajes genéticos principales de SARM con carácter pandémico: Clona Británica (ST36), Clona Pediátrica (ST5), Clona Nueva York (ST5), Clona Japón (ST5) y Clona Ibérica (ST274) (Enright et al., 2002). Actualmente, han surgido nuevas cepas de interés epidemiológico, SARM-AC-ST30, SARM-AC-ST80, SARM-AC-ST59, SARM-AC-ST8 (clona USA 300), ésta última presente en patologías típicas de hospital (Diep y Otto, 2008). Estudios realizados en animales de compañía revelan que las cepas SARM encontradas en éstos animales son idénticas a las encontradas en hospitales humanos mientras que aquellas encontradas en otras especies animales (ganado bovino, cerdos, equinos y aves) parecen ser distintas (Leonard y Markey, 2008). Debido a la versatilidad de *S. aureus* como patógeno y para evaluar la transmisibilidad de las cepas asociadas a mastitis bovina, el objetivo de este trabajo fue analizar la estructura genética de la población de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis y de humanos involucrados en actividades pecuarias en granjas familiares del municipio de Tarímbaro, Michoacán, utilizando el análisis de MLST.

Materiales y métodos

Aislados de *S. aureus*

Se analizaron aislados de diferente origen epidemiológico. La recolección de muestras se realizó de acuerdo a Blanco (2001), utilizando un modelo aleatorio de distribución proporcional

Ilustración 1. Fundamento de la caracterización mediante análisis de secuencias multilocus (MLST). a) Cepa de *S. aureus* con los genes que codifican para las enzimas de metabolismo primario carbamato-cinasa (*arcC*), shiquimato-deshidrogenasa (*aroE*), glicerol-cinasa (*glpF*), guanilato-cinasa (*gmk*), fosfo-acetil transferasa (*pta*), triosa-fosfato isomerasa (*tpi*) y acetil coenzima A-acetil transferasa (*yqjL*). Las cepas que comparten un ST se grafican como un círculo cuyo tamaño depende de la frecuencia con que se reporte dicho ST en la base de datos. b) Mediante la amplificación por PCR y la secuenciación de fragmentos de los 7 genes, se asigna el número de alelo correspondiente para cada gen hasta obtener su "código de barras" alélico o perfil alélico (3,3,1,1,4,4,3) y así, designar la Secuencia Tipo (ST8) exclusiva para cada combinación de alelos. c) Cuando ocurre una mutación en alguno de los alelos, la combinación de alelos se modifica y se genera en un ST distinto a la cepa original. d) Los cambios pueden generarse en cualquiera de los alelos, en cualquier posición, generando nuevas ST. d') A la variante en un solo alelo (locus) respecto a la cepa original, se le denomina variante de un solo locus (SLV, por sus siglas en inglés). e) Una cepa que haya experimentado un cambio en alguno de los genes puede nuevamente experimentar otro en un segundo gen. e') La acumulación de dos cambios, uno en cada gen genera una variante de doble loci (DLV), respecto a la cepa original. En las gráficas obtenidas mediante el programa eBURST, los STs más frecuentes y con mayor número de alelos compartidos se representan como círculos centrales y se consideran como clonas fundadoras (a), mientras que sus variantes alélicas se derivan de ellos mediante líneas que derivan de la clona fundadora como variantes de uno (d') o dos loci (e').



(Bautista-Trujillo *et al.*, 2013). El aislamiento de *S. aureus* se realizó utilizando los medios de cultivo agar Staphylococcus-110 (S110), agar sangre (AS) y/o CHROMagar™ Staph. aureus (CSA) (Gaillet *et al.*, 2000). La confirmación de la identidad de los aislados se realizó mediante detección de las actividades de hemólisis y coagulasa, pruebas bioquímicas y por secuenciación de la región variable 3' del gen de ARN ribosomal 16S (Bautista-Trujillo *et al.*, 2013). Un total de 40 aislados fueron utilizados para el análisis de MLST: 31 aislados del municipio de Tarímbaro, Michoacán (2 de origen humano, 1 de fomite y 28 de leche proveniente de vacas afectadas con mastitis bovina), 5 aislados de una colección de casos de mastitis del estado de México, 3 aislados de casos de mastitis clínica de Yuriria, Guanajuato y la cepa de referencia ATCC27543 (American Type Culture Collection; Manassas, VA. USA). Los aislados se denominaron MRI (Mastitis Related Isolate) seguido del número consecutivo de aislamiento.

Secuenciación y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas del gen de ARNr 16S fueron comparadas con las de bancos de secuencias (GenBank). Se utilizó el algoritmo BlastN en la página disponible en el sitio de Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias que presentaron mayor similitud, se compararon y alinearon con el programa Clustal W para la construcción del árbol filogenético, los alineamientos se importaron al Software MEGA v5.01 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2007) y la construcción se realizó utilizando el algoritmo de Neighbor-joining, utilizando la matriz de comparación de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980), con un análisis bootstrap de 1000 repeticiones. Para el análisis filogenético utilizando los datos de MLST, las secuencias de los alelos se usaron para construir una sola "megasecuencia" para cada cepa colocándolas secuencialmente en el orden *arcC*, *aroE*, *glfP*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqiL* (Enright *et al.*, 2000).

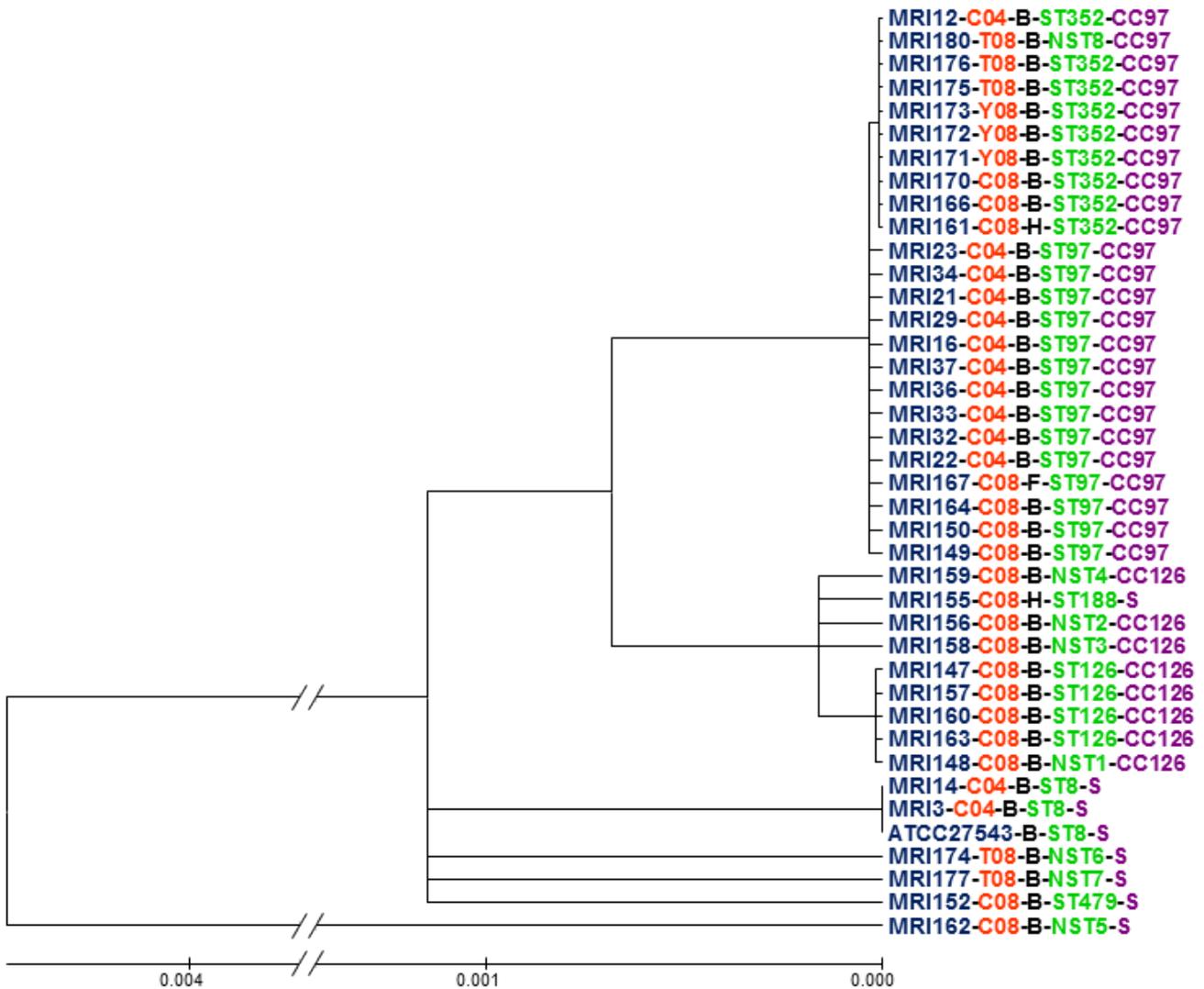


Figura 1. Relación filogenética de los aislados. Secuencias de los 7 genes del MLST analizadas por Neighbor-Joining (NJ). Bootstrap de 1000 repeticiones, verosimilitud compuesta, utilizando todos los marcos de lectura abiertos (MLA). En azul, nombre del aislado asociado a mastitis bovina (MRI); en naranja, año y región del muestreo (C04, región Cótzio- Téjaro 2004; C08, región Cótzio- Téjaro 2008; Y08, región Yuriria 2008; T08, región Toluca 2008); en negro, B, bovino, H, humano, F, fomite; en verde, Secuencia Tipo (ST ó NST) y en morado, Complejo Clonal (CC) ó singulotón (S). Los grupos definidos, en su mayoría, coinciden con los STs, agrupando además de acuerdo a la región y año de muestreo.

Tabla 1. Perfil alélico y origen de los aislados de *S. aureus*.

Aislado	Origen	Región	Año	Perfil Alélico	Secuencia-Tipo (ST)
ATCC27543	Leche			3,3,1,1,4,4,3	8
MRI 3	Leche	Tarímbaro	2004	3,3,1,1,4,4,3	8
MRI 12	Leche	Tarímbaro	2004	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 14	Leche	Tarímbaro	2004	3,3,1,1,4,4,3	8
MRI 16	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 21	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 22	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 23	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 29	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 32	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 33	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 34	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 36	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 37	Leche	Tarímbaro	2004	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 147	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,5,40	126
MRI 148	Leche	Tarímbaro	2008	3,Na-1,1,4,1,5,40	NST-1
MRI 149	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 150	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 152	Leche	Tarímbaro	2008	52,79,54,18,56,32,65	479
MRI 155	Humano	Tarímbaro	2008	3,1,1,8,1,1,1	188
MRI 156	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,1,40	NST-2
MRI 157	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,5,40	126
MRI 158	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,4,1,5,1	NST-3
MRI 159	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,4,1,5,40	NST-4
MRI 160	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,4,1,5,40	126
MRI 161	Humano	Tarímbaro	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 162	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,Na-2,1,1,Na-3,11	NST-5
MRI 163	Leche	Tarímbaro	2008	3,68,1,1,1,5,40	126
MRI 164	Leche	Tarímbaro	2008	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 166	Leche	Tarímbaro	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 167	Fomite	Tarímbaro	2008	3,1,1,1,1,5,3	97
MRI 170	Leche	Tarímbaro	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 171	Leche	Yuriria	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 172	Leche	Yuriria	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 173	Leche	Yuriria	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 174	Leche	Toluca	2008	3,79,1,1,1,32,3	NST-6
MRI 175	Leche	Toluca	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 176	Leche	Toluca	2008	3,78,1,1,1,5,3	352
MRI 177	Leche	Toluca	2008	3,79,1,18,56,5,3	NST-7
MRI 180	Leche	Toluca	2008	3,Na-4,1,1,1,5,3	NST-8

Perfil alélico: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*. Na: nuevo alelo. NST: nueva Secuencia-tipo.

Multilocus sequence typing (MLST)

Para la caracterización mediante análisis de secuencias multilocus (MLST, **Ilustración 1**) el ADN se obtuvo por el método modificado de Enright *et al.*, (2000). La amplificación y secuenciación de los fragmentos de los genes que codifican para las enzimas carbamato-cinasa (*arcC*), shiquimato-deshidrogenasa (*aroE*), glicerol-cinasa (*glpF*), guanilato-cinasa (*gmk*), fosfo-acetil transferasa (*pta*), triosa-fosfato isomerasa (*tpi*) y acetil coenzima A-acetil transferasa (*yqiL*) se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Enright *et al.*, (2000). Brevemente, en una reacción de 50 µL se agregaron 0.5 µg de ADN genómico, 0.5 µg de cada uno de los oligonucleótidos, 1 U de ADN *Taq* polimerasa (PROMEGA, Madison, Wisconsin, USA), 5 µL de buffer 10X (suministrado con la polimerasa), y, 0.2 mM deoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos de alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min y desnaturalización a 95 °C por 1 min, y finalmente un ciclo a 72 °C por 5 min. La limpieza de los productos de PCR se realizó con la combinación de 1 unidad de Exonucleasa I y 1 unidad de fosfatasa alcalina de camarón (Fermentas). La secuenciación de los productos obtenidos se realizó en el Laboratorio de Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-Campus Guanajuato. Los alelos de cada gen se compararon con los reportados en la base de datos de MLST del Imperial College de Londres de *Staphylococcus aureus* (<http://www.mslt.net>) para la designación del número de alelo correspondiente. Con la combinación de alelos se designó la Secuencia-Tipo (ST). La elaboración del árbol de mínima dispersión se realizó con el software disponible en <http://pubmlst.org/>. El agrupamiento de los STs en Complejos Clonales se realizó mediante el algoritmo eBURST v3 de libre en acceso en <http://saureus.mlst.net/>. La asociación de los STs reportados con hospederos o patologías específicos se obtuvo de la base de datos.

Resultados

Se analizaron 39 aislados y la cepa de referencia ATCC27543, su origen, región y perfil alélico se muestran en la **Tabla 1**. Se identificaron 14 STs (8 no reportados) y 4 alelos nuevos (Na). 5 de los 8 STs nuevos (NST) fueron encontrados en los aislados de la región de Tarímbaro del 2008 en muestras de leche. Los STs se agruparon en 2 complejos clonales, uno derivado del ST97 (CC97) y el CC126. Los STs 8, 188, 479, NST-5, NST-6 y NST-7 y NST-8 fueron singulotones, es decir, no agruparon en ninguno de estos (**Figura 3**). En el caso de los alelos *aroE*, *glpF* y *tpi* se observó la presencia de alelos nuevos (Na) que generaron nuevas ST (NST) en aislados de Tarímbaro y Toluca (**Tabla 1**). Los alelos *aroE*, *tpi* y *yqiL* fueron los que se presentaron con mayor frecuencia (**Tabla 2**). Los alelos nuevos se presentaron para los genes *aroE*, *glpF* y *tpi*.

La relación filogenética entre los aislados de *S. aureus* utilizando las secuencias de los alelos fusionadas en una sola secuencia, denominada megasecuencia, se muestra en la **Figura 1**. Los aislados se distribuyeron en dos grupos, uno conformado por los aislados con ST97 y ST 352, pertenecientes al CC97 y otro por los aislados con ST126 y NST1, NST2, NST3 Y NST4, pertenecientes al CC126. El grupo del ST97 estuvo representado por aislados de diferente origen epidemiológico (bovino, humano y fomite) y geográfico (Tarímbaro, Yuriria y Toluca). Las ST126 y las NST-1 a NST-8 estuvieron asociados a bovinos y humanos exclusivamente del municipio de Tarímbaro. Los STs nuevos se distribuyeron en todos los grupos definidos exclusivamente en las colectas de 2008. STs pertenecientes al mismo complejo clonal (CC) también se ubican dentro del mismo grupo. Los aislados MRI174, MRI177, MRI152 Y MRI162 no agruparon con el resto de los aislados; 3 de ellos presentaron NSTs.

Para agrupar a los aislados en base al perfil alélico y predecir si existe una relación de origen entre las cepas y así determinar la posible presencia de clonas fundadoras, se elaboró un árbol de mínima dispersión (**Figura 2**). Se observa la formación de 2 grupos, el asociado a la ST97 es el más numeroso y representado en su mayoría por aislados de bovino. La ST352 es la segunda en prevalencia

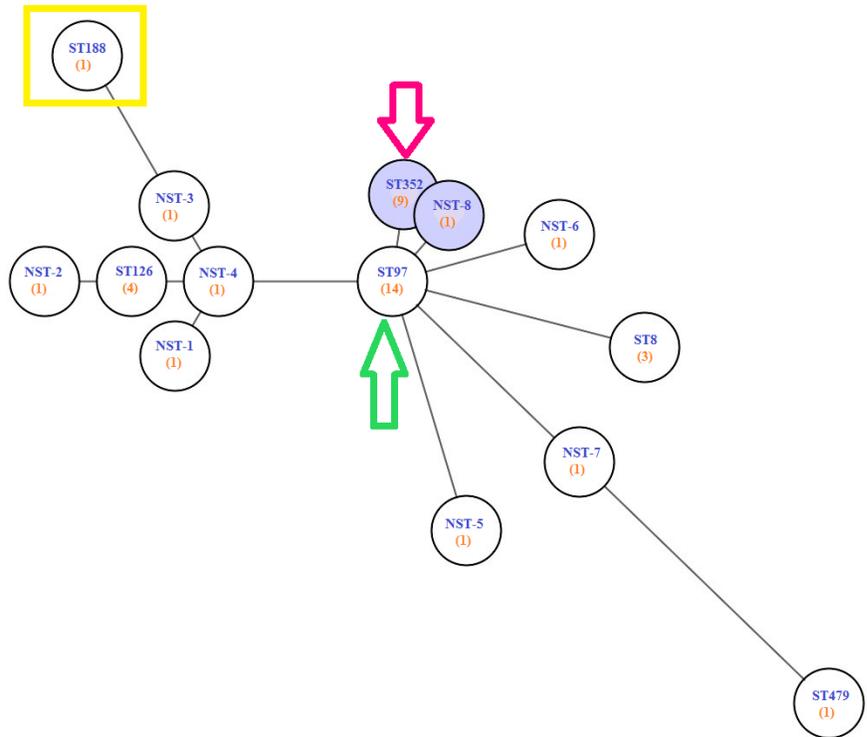


Figura 2. Agrupamiento de los aislados en base al perfil alélico. Mediante una herramienta disponible en <http://pubmlst.org> que utiliza el algoritmo de Prim se elaboró un árbol de mínima dispersión. Se observa la distribución de los aislados en 2 grupos, derivados del ST97. En azul se señala al ST y en naranja la frecuencia del mismo. El recuadro amarillo señala un ST de origen humano. La flecha verde indica el ST con aislados de origen bovino y humano. Por su parte, la flecha rosa muestra el ST más prevalente.

y se relaciona estrechamente con ST97. ST352 es representado por aislados de origen bovino y humano, así como de las 3 regiones en estudio. En el segundo grupo se encuentran las ST126 y varios de los NSTs. El ST188 agrupa sólo a un aislado de origen humano.

Para determinar la relación genética entre los aislados, conocer su agrupación y determinar el posible genotipo fundador de cada grupo, se elaboró un mapa con el algoritmo eBURST. Los datos de frecuencia del ST y número de alelos compartidos se muestran en la **tabla 3**. El diagrama de eBURST se muestra en la **figura 3**.

Los aislados de las regiones en estudio se agrupan localmente en 2 Complejos Clonales principales, CC97 y CC126 (**Tabla 3**). Los aislados pertenecientes al mismo CC comparten hasta 6 alelos. El CC97 es el más numeroso (**Tabla 3**) con un total de 24 aislados representativos de las 3 regiones en estudio y de los diferentes orígenes epidemiológicos (bovino, humano y fomite). La ST fundadora de este CC es la ST97, ya que cuenta con la mayor frecuencia de aislados y el mayor número de variaciones de uno o dos *loci* respecto

a los demás STs. Los STs 352 y 97 han sido reportados previamente en animales domésticos, principalmente. Por su parte, el CC126 se integra, exclusivamente, por aislados de leche de bovino del año 2008 de la región de Tarímbaro (**Tabla 3**). La ST126 (reportado previamente en leche de bovino) se comporta como fundador de este CC. El resto de STs del CC, variantes de un solo locus del ST126, no han sido antes reportados. Los STs que no agruparon en ninguno de los CC de nuestra población fueron ST8, ST188, NST-5, NST-6, NST-7 y el ST479.

El comportamiento de los aislados en el

Tabla 2. Frecuencia de los alelos.

GEN	Tamaño del fragmento amplificado	Número de alelos
<i>arcC</i>	456	2
<i>aroE</i>	456	7
<i>glpF</i>	465	3
<i>gmk</i>	417	4
<i>pta</i>	474	3
<i>tpi</i>	402	5
<i>yqiL</i>	516	5

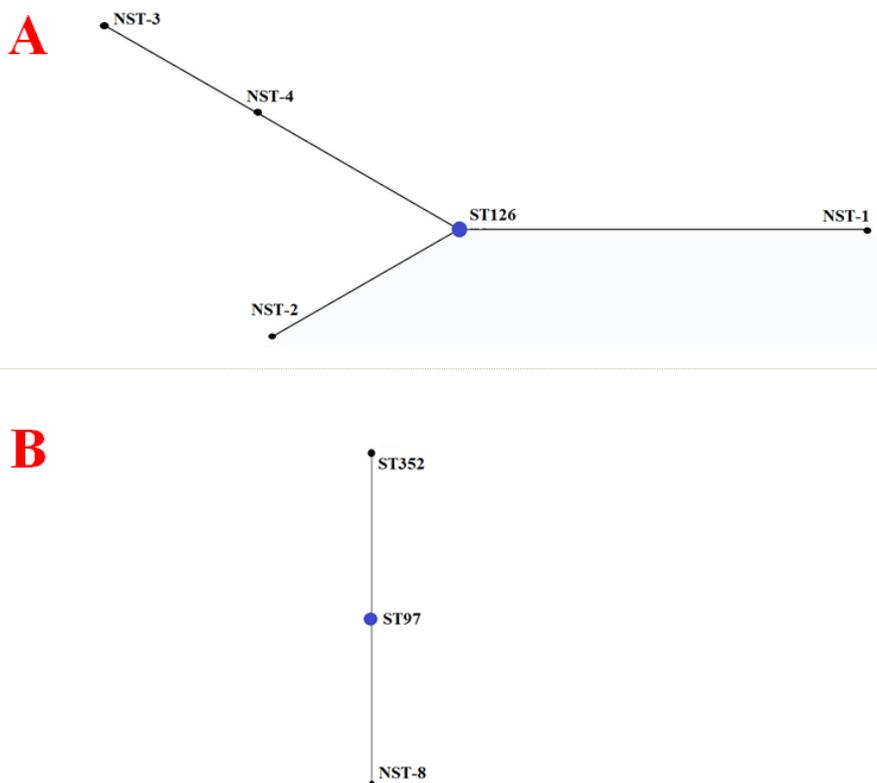


Figura 3. Agrupamiento de los aislados de la región de Tarímbaro y complementarios en Complejos Clonales (CC). Se forman 2 Complejos Clonales de acuerdo al algoritmo eBURST. En A, complejo clonal 126; B, complejo clonal 97. En azul se muestran las clonas fundadoras y en negro las variantes alélicas de uno y dos loci. Los STs 8, 188, NST-5, NST-6, NST-7 y 479 no agruparon en ningún CC y fueron denominados singulotones (no mostrados en la figura).

contexto mundial se estableció utilizando el algoritmo eBURST y la base de datos global disponible en el sitio <http://www.saureus.mlst.net>. Fueron incluidos 5127 aislados de *S. aureus* de la base de datos y los 39 de este estudio (Tabla 4, Figura 4). Los aislados fueron agrupados en los CC5 y CC479, a excepción de los NST-5, NST-6 y NST-7 que no agruparon en ningún CC. El ST8 agrupó en el CC5 en donde se distribuyen STs característicos de comunidad y hospital. En el CC474 sólo se agrupó el ST479. Los STs locales forman parte de subgrupos del ST97 y del ST352 (Figura 4) reportados previamente en animales de granja.

Los STs presentes en casos de mastitis subclínica fueron ST97, ST352, ST126, ST474, NST-1, NST-3, NST-4 y NST-5, siendo el más prevalente el ST126. Para el caso de la mastitis en su forma clínica, el NST-2 fue el único evento identificado.

Discusión

La discriminación entre aislados microbianos y la determinación de su linaje genético a través de técnicas moleculares permite

hacer observaciones respecto al origen, evolución, epidemiología y diseminación de clonas de importancia en la salud pública, como el caso de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM). SARM presenta clonas específicas de hospital, de comunidad y asociadas a animales, que representan riesgo de transmisión entre hospederos (Aires de Sousa *et al.*, 2007; Ben Zakour *et al.*, 2008; Fitzgerald, 2012; Guinane *et al.*, 2010; Grundmann *et al.*, 2010; Lowder *et al.*, 2009). La determinación del linaje genético además, permite hacer un acercamiento al proceso de patogénesis (Turner y Feil, 2007) si se toman en cuenta otras variables genéticas relacionadas con la patogenicidad y virulencia. Previamente se había intentado describir la estructura genética de aislados bacterianos del género *Staphylococcus* spp. asociados a la mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro en Michoacán de Ocampo, utilizando amplificación al azar de ADN polimórfico o RAPD por sus siglas en inglés (Lopez-Meza *et al.*, 2006). Posteriormente se realizó la identificación precisa de los aislados utilizando secuenciación parcial

del gen de ARN ribosomal 16S y se demostró que los aislados no pertenecían al género *Staphylococcus* (Anaya-Lopez *et al.*, 2006). Con lo anterior, el presente reporte se convierte en el primero en describir la estructura genética de una población de *Staphylococcus aureus* asociado a mastitis bovina en el Estado de Michoacán de Ocampo.

Mediante MLST se identificaron 18 STs de las cuales 8 no han sido antes reportadas. La variación en las secuencias de los alelos *aroE*, *glpF* y *tpi* dio origen a nuevos alelos en aislados de Tarímbaro y Toluca. La alta diversidad que presenta el alelo *aroE* puede ser consecuencia del fenómeno de *hitchhiking* [traslado], ocasionado por la alta presión de selección de la que es sujeto el gen *clfB*, que es un factor de virulencia que codifica para el factor de agregación B, ya que *aroE* y *clfB* se encuentran en loci cercanos en el genoma (Cooper y Feil, 2004).

Los STs encontrados en el municipio de Tarímbaro, señalan un grupo de aislados de *S. aureus* con características regionales. La mayoría de estos genotipos han sido asociados a animales, bovinos principalmente. En Tarímbaro la ST97 es el más prevalente, ya que estuvo presente en 14 aislados. La ST97 es el genotipo con mayor prevalencia a nivel mundial en casos de mastitis bovina.

La ST352 fue la segunda más abundante y ha sido reportada en muestras de leche provenientes de tanques de almacenamiento. La ST352 parece poseer características genotípicas que le permiten colonizar diferentes hospederos ya que se encontró en vacas con mastitis y en humano involucrado en actividades pecuarias. Las actividades pecuarias que incluyen la manipulación de animales de granja tales como procesos de ordeña, aplicación de medicamentos, curaciones de heridas y procesos de matanza, incrementan el riesgo de transmisión de *S. aureus* de origen animal hacia los humanos (Fitzgerald, 2012). Esta ST, es una variante de un solo locus de la ST97, que fue encontrada también en uno de los utensilios del proceso de ordeño que pudo servir de fomite para transmisión entre hospederos.

Las ST8 y ST188 tienen su posible origen en aislados asociados a enfermedades de comunidad y de riesgo nosocomial

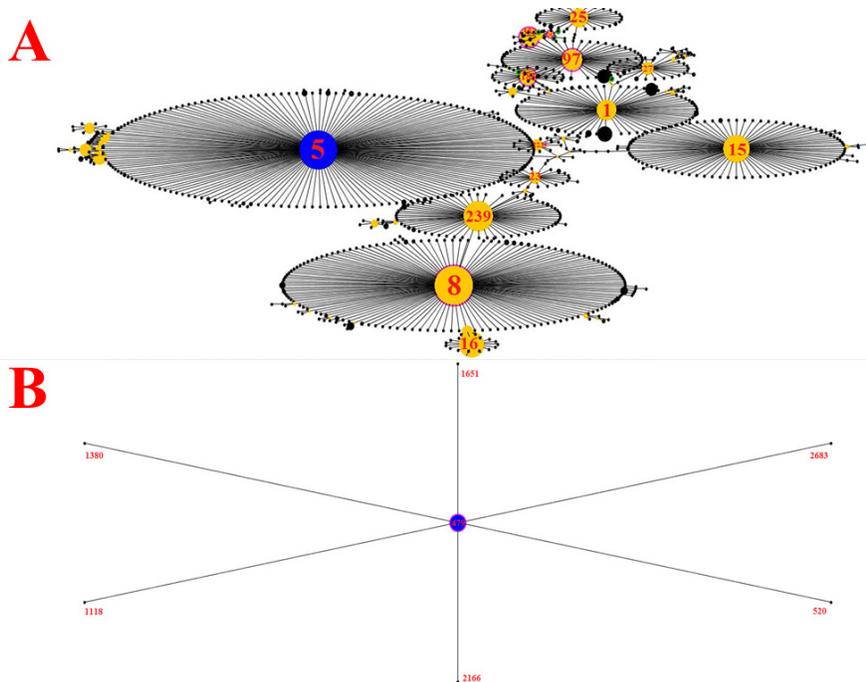


Figura 4. Complejos Clonales definidos para los aislados de *S. aureus* locales en el contexto mundial. En el panel A se muestra al CC5, la clona fundadora marcada en azul, los STs que definen a los subgrupos en amarillo. Los aislados locales se ubican en los subgrupos del ST97 y el ST352 asociados a animales, principalmente. En el panel B se muestra al CC479, sólo uno de los aislados de origen bovino se ubicó en este CC. De las nuevas secuencias tipo (NST) la 5,6, y 7 no agruparon en ningún CC.

en humanos, sin embargo, han sido encontrados en caballos y bovinos aunque con baja frecuencia (Walther *et al.*, 2009). Es interesante que el genotipo ST8 se encuentre asociado a una de las clonas pandémicas de SARM más importante en la época actual, la clona USA300. USA 300 es una clona de *S. aureus* con ST8, *spa*-tipo t008, *SCCmec* IV, el elemento genético móvil de catabolismo de arginina (ACME), la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) y un patrón de restricción distintivo por electroforesis de campos pulsados (Diep y Otto 2008). El aislamiento MRI3 con ST8 encontrado en nuestras muestras fue sensible a meticilina (SASM). Esto sugiere que el aislamiento no está estrechamente relacionado con la clona USA300, pero comparten un mismo fondo genético. El hallazgo de aislados con ST8 en bovinos debe traducirse en una alerta para la vigilancia epidemiológica de esta cepa en ganado bovino, ya que la glándula mamaria con mastitis contiene una gran variedad de *Staphylococcus* sp. asociados (Bautista-Trujillo *et al.*, 2013), mismos que pueden contener algunos elementos genéticos móviles como el cassette *SCCmec* que confiere resistencia a meticilina y la toxina PVL (Bautista-

Trujillo *et al.*, en preparación) que puede ser transferidos horizontalmente al genotipo ST8 bovino, aumentando su virulencia y/o rango de hospedero. De hecho, Tewhey *et al.* (2012) demostraron que las cepas USA300 son genéticamente muy homogéneas, y solamente difieren unos cuantos indels y SNPs.

La relación filogenética de los aislados (Figura 1) indica una cercanía evolutiva entre los STs que han sido identificados en animales (ST97, ST126 y ST352) y un agrupamiento distinto para 3 de los nuevos STs (NST-5, NST-6 y NST-7). La poca variabilidad en la secuencias de los aislados puede indicar que el tropismo de hospedero sea producto de la combinación de genes de virulencia. En nuestro grupo, Bautista-Trujillo *et al.* (en preparación) han encontrado la asociación de una combinación de alotipos de genes de adhesinas asociados a la mastitis bovina que pudiera explicar este tropismo.

El análisis eBURST con sólo los aislados del municipio de Tarímbaro y las otras 2 regiones complementarias (Tabla 3) muestran una distribución de los STs en 2 Complejos Clonales locales (CC126 y CC97) que coinciden con al análisis filogenético (Figura 1). Los

STs nuevos sólo se presentaron en los aislados del 2008, lo cual podría indicar una diversificación directa del ST97 del 2004 o la introducción de estos genotipos en la región de muestreo. El ST8 no fue prevalente en la región de Tarímbaro probablemente por la falta de adaptabilidad en el medio ambiente al interior de la glándula mamaria de la ubre pues es un genotipo asociado a patologías clínicas y de comunidad abierta en humanos (Diep y Otto, 2008). ST97 es un genotipo comúnmente aislado de casos de mastitis bovina y ST126 se ha aislado tanto de ubres infectadas como del tanque de almacenamiento de leche (Smith *et al.*, 2005).

A nivel mundial (Tabla 4 y Figura 4) los aislados de las regiones estudiadas se agrupan en los CC5 y CC479, además de un grupo de aislados que no agrupan en ningún CC (singulotones). El CC5 agrupa a STs de origen nosocomial y de comunidad de humanos (Bustos-Martínez *et al.*, 2006), STs de origen aviar (Bystron *et al.*, 2010) o aisladas de perros (Gómez-Sanz *et al.*, 2013), además de las clonas pandémicas Nueva York, Japón y pediátrica. En este grupo prácticamente todos los aislados del estudio estuvieron presentes. La mayoría de STs regionales forman un subgrupo derivado del ST97 (Figura 4). En el CC479, por su parte, sólo se ubicó al ST479 de origen bovino.

Al buscar correlación entre los genotipos determinados y las formas de la mastitis (clínica o subclínica) mediante un análisis de regresión logística, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Sin embargo, en el caso de las mastitis en su forma subclínica la ST126 se asoció con mayor frecuencia, mientras que la NST-2, se encontró solamente en el caso de mastitis clínica. El ST352 (reportado como asociado a casos de mastitis bovina) fue encontrado también en una muestra de humano.

El hallazgo de genotipos de *S. aureus* típicos de bovinos en humanos y de humanos en bovinos evidencia el riesgo zoonótico que implican las prácticas de manejo de los animales en granjas familiares para la transmisión y diseminación de éste patógeno. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios más profundos de epidemiología molecular para establecer el flujo de estos genotipos

Tabla 3. Asociación local de *S. aureus* en Complejos Clonales mediante análisis de eBURST.

***Staphylococcus aureus* en el municipio de Tarímbaro, Michoacán**
 No. de aislados: 40
 No. de STs= 14
 No. de réplicas por bootstrapping= 1000
 No. de loci por aislado= 7
 No. de loci idénticos para la definición de grupo= 6
 No. de grupos= 2

COMPLEJO CLONAL 126

No. de aislados: 8
 No. de STs= 5
 Posible fundadora: **ST126**

ST	Frecuencia	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap	
							Grupo	Subgrupo
ST126	4	3	1	0	0	1.25	46%	16%
NST-4	1	3	1	0	0	1.25	47%	16%
NST-1	1	2	2	0	0	1.5	4%	0%
NST-3	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
NST-2	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%

COMPLEJO CLONAL 97

No. de aislados: 24
 No. de STs: 3
 Posible fundadora: **ST97**

ST	Frecuencia	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap	
							Grupo	Subgrupo
ST126	4	3	1	0	0	1.25	46%	16%
NST-4	1	3	1	0	0	1.25	47%	16%
NST-1	1	2	2	0	0	1.5	4%	0%
NST-3	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
NST-2	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%

NO AGRUPADOS

NST-5
 NST-6
 NST-7
 ST479
 ST8
 ST188

ST: secuencia tipo; SLV: variante de un solo locus; DLV: variante de doble loci; TLV: variante de triple loci; SAT: secuencia satélite.

entre los diferentes hospederos, su capacidad de transmitir horizontalmente genes de virulencia y la asociación entre posibles polimorfismos en estos genes de virulencia con los fondos genéticos exitosos en los casos de mastitis subclínica (ST126) o clínica (NST-2). Es importante, para el caso de patógenos versátiles como es el caso de *S. aureus*, establecer programas de vigilancia epidemiológica que permitan evidenciar el potencial zoonótico de los genotipos involucrados.

Agradecimientos

El trabajo fue financiado con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica (Proyecto 14.7 2008-2010) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 56741) para la realización de este trabajo. D.A.A. fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. A la Dra. Ana María Ríos Alanis por la donación de las cepas de Yuriria y al Dr. Valente Velázquez Ordoñez por la donación de las cepas de Toluca. Los autores agradecen a los propietarios de las granjas las facilidades para la toma de muestras.

Referencias

Aires de Sousa M, Parente CESR, Vieira da Motta O, Bonna ICF, Silva DA, de Lencastre H. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3845-3849

Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC, Calado E, Castro AP, Ramos MH, Amorim JM, de Lencastre H. 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2881-2888

Anaya-López JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ, Ochoa-Zarzosa A. 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81: 358-361

Apolonio-Alonso AN, Acosta-Gío AE, Bustos-Martínez J, Hamdam-Partida A. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among dental patients. *Am. J. Infect. Control.* 39: 254-255

Tabla 4. Asociación global de *S. aureus* en Complejos Clonales mediante análisis de eBURST.

<i>Staphylococcus aureus</i> en el municipio de Tarímbaro, Michoacán	
No. de aislados:	5127
No. de STs=	2302
No. de réplicas por bootstrapping=	1000
No. de loci por aislado=	7
No. de loci idénticos para la definición de grupo=	6
No. de grupos=	72

COMPLEJO CLONAL 5

No. de aislados: 2541

No. de STs= 912

Posible fundadora: **ST5**

ST	Frecuencia	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap	
							Grupo	Subgrupo
ST8	251	138	95	71	607	4.21	37%	100%
ST97	72	52	27	133	699	4.42	0%	100%
ST88	45	24	32	111	744	4.82	0%	100%
ST352	60	15	47	106	743	4.64	0%	86%
NST-8	1	10	51	107	743	4.65	0%	11%
ST126	6	5	2	33	871	5.25	0%	59%
NST-4	1	4	18	63	826	5.02	0%	7%
NST-3	1	3	23	105	780	4.92	0%	0%
NST-1	1	2	5	33	871	5.25	0%	0%
NST-2	1	1	8	43	859	4.96	0%	0%

COMPLEJO CLONAL 479

No. de aislados: 51

No. de STs: 7

Posible fundadora: **ST479**

ST	Frecuencia	SLV	DLV	TLV	SAT	Distancia Promedio	ST Bootstrap	
							Grupo	Subgrupo
ST479	45	6	0	0	0	1.0%	99%	94%

NO AGRUPADOS

NST-5

NST-6

NST-7

ST: secuencia tipo; SLV: variante de un solo locus; DLV: variante de doble loci; TLV: variante de triple loci; SAT: secuencia satélite.

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

Ben Zakour NL, Sturdevant DE, Even S, Guinane CM, Barbey C, Alves PD, Cochet ME, Gautier M, Otto M, Fitzgerald JS, Le Loir Y. 2008. Genome-Wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. *J. Bacteriol.* 190: 6302-6317

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

Bystron J, Podkowik M, Piasecki T, Wieliczko A, Molenda J, Bania J. 2010. Genotypes and enterotoxin gene content of *S. aureus* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* 144: 498-501.

Cooper JE, Feil EJ. 2004. Multilocus sequence typing- what is resolved? *Trends Microbiol.* 12: 373-377

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

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

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1008-1015

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt B. G. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 7687-7692

Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, Enright MC, Berendt T, Peacock SJ, Smith JM, Murphy M, Spratt BG, Moore CE, Day NP. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 185: 3307-3316

Fitzgerald JR. 2012. Livestock- associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends Microbiol.* 20: 192-198

- Gaillot O, Wetsch M, Fortineau N, Berche P.** 2000. Evaluation of CHROMagar Staph.aureus® a new chromogenic medium for presumptive identification of *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1587-1591
- Gomez-Sanz E, Torres C, Benito D, Lozano C, Zarazaga M.** 2013. Animal and human *Staphylococcus aureus* clonal lineages and high rates of *Staphylococcus intermedius* novel lineages in Spanish kennel dogs: predominance of *S. aureus* ST398. *Vet. Microbiol.* 166: 580-589.
- Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaara CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW.** 2010. Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular- epidemiological analysis. *PLoS Med.* 7: e1000215
- Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Linsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR.** 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* 2: 454-466
- Hamdan-Partida A, Sainz-Espuñes T, Bustos-Martínez J.** 2010. Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a Mexican community. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1701-1705
- Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG.** 1992. CDC definitions of nosocomial surgical site infections 1992: a modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17: 780-785
- Kimura M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H.** 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 505-520
- Leonard FC, Markey BK.** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Vet. J.* 175: 27-36
- Librado P, Rozas J.** 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Linsay JA.** 2008. *Staphylococcus molecular genetics*. Caister Academic Press. Great Britain. Pp. 278
- Lopez-Meza JE, Higuera-Ramos JE, Ochoa-Zarzosa A, Chassin-Noria O, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM.** 2006. Caracterización molecular de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Tec. Pecu. Mex.* 44: 91-106.
- Lowder BV, Guinane CM, Zakour NLB, Weinert LA, Morris AC, Cartwright RA, Simpson AJ, Rambaut A, Nübel U, Fitzgerald JR.** 2009. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 19545-19550
- Maiden MCJ.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 561-588
- Velázquez-Meza ME, Ayala-Gaytán J, Carnalla-Barajas MN, Soto-Noguero A, Guajardo-Lara CE, Echanis-Aviles G.** 2011. First report of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) in México. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3099-3100
- Plozza K, Lievaart JJ, Potts G, Barkema HW.** 2011. Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. *Aust. Vet. J.* 89: 41-46
- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken DH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG.** 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4737-43.
- Smyth SD, Meaney JW, Hartigan JP, Smyth JC.** 2007. Occurrence of *ssl* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* from animal infection. *J. Med. Microbiol.* 56: 418-425
- Smyth SD, Feil JE, Meaney JW, Hartigan JP, Tollersrud T, Fitzgerald RJ, Enright CM, Smyth JC.** 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 58: 1343-1353
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Turner KME, Feil EJ.** 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29: 129-135
- Valdez-Alarcón JJ, Bustos-Martínez JA, Solorio-Rivera JL, Gutiérrez-Vázquez E, Baizabal-Aguirre VM, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M.** 2012. Comunidades microbianas complejas en modelos bovinos: retos para la salud pública y la producción pecuaria. En: Carreón-Abud Y, Mendoza-deGives P, Rodríguez-Guzmán MP. (eds.), *Los microorganismos y su importancia biotecnológica y ecológica*. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos; Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ISBN: 978-607-424-248-5. Pp. 29-34.
- Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehrlich R, Slickers P, Soba A, Wleklinski CG, Wieler LH, Lübke-Becker A.** 2009. Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 47: 704-710
- Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A.** 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1931-1939