

# Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México

## *Staphylococcus aureus* biotypes in cows presenting subclinical mastitis from family dairy herds in the Central-Eastern State of Mexico

Ana María Manjarrez López<sup>a</sup>, Soledad Díaz Zarco<sup>a</sup>, Félix Salazar García<sup>a</sup>, Benjamín Valladares Carranza<sup>a</sup>, Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo<sup>a</sup>, Alberto Barbabosa Plliego<sup>a</sup>, Martín Talavera Rojas<sup>a</sup>, María Uxúa Alonso Fresán<sup>a</sup>, Valente Velázquez Ordoñez<sup>a</sup>

### RESUMEN

La mastitis ocasiona grandes pérdidas económicas en los hatos lecheros. El *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causales de la enfermedad, considerado de importancia en la salud pública y la salud del hato. El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de *S. aureus* y los biotipos predominantes en vacas con mastitis subclínica en hatos de producción lechera familiar en la región económica I, Centro-Este del Estado de México. Se condujo un estudio trasversal, en 269 vacas de diferentes etapas de lactación e información del hato en una encuesta cerrada. La muestra de leche se recolectó de cada vaca. La detección de mastitis se realizó mediante la prueba de California. Los biotipos de *S. aureus* se caracterizaron por medio de la técnica de agar tripticasa soya adicionado con cristal violeta 1:100,000. En las vacas estudiadas la prevalencia de mastitis subclínica fue del 48.3 % (IC<sub>95%</sub> 42.22 a 54.47) y de mastitis clínica 6.1 % (IC<sub>95%</sub> 3.44 a 9.48). Se obtuvieron 62 aislamientos de *S. aureus*, el 79 % correspondió al biotipo C (humano), el 11.3 % al A (bovino), el 6.5 % al E (canino) y el 3.2 % a hospederos no específicos. El tamaño del hato resultó un factor de riesgo asociado a la mayor frecuencia de *S. aureus*, especialmente cuando el hato fue mayor de 13 vacas (OR=5.63, IC<sub>95%</sub> 1.72 a 18.21). Se identificó una prevalencia elevada de mastitis subclínica asociada a la infección por *S. aureus* Biotipos C y A considerados de importancia en la salud pública.

**PALABRAS CLAVE:** Mastitis bovina, Explotaciones familiares, *Staphylococcus aureus*, Biotipos, Salud pública.

### ABSTRACT

Mastitis causes great economic loss in dairy farms. One of the main agents involved is *Staphylococcus aureus*, which is important not only in public health but in herd health as well. The aim of this study was to determine *S. aureus* frequency and the predominant biotypes in cows presenting subclinical mastitis from family dairy farms in the Central-Eastern zone of the State of Mexico. A transversal study was conducted considering 269 dairy cows in different lactation periods and herd information was taken through a closed questionnaire. Individual milk samples were taken and California test was used for mastitis detection. Biotypes were identified using soy tripticase agar with violet cristal added (1:100,000). Results show a subclinical mastitis prevalence of 48.3 % (CI<sub>95%</sub> 42.22 to 54.47) and for clinical mastitis 6.1 % (CI<sub>95%</sub> 3.44 to 9.48). 62 *S. aureus* isolations were obtained, from which 79 % were biotype C (Human), 11.3 % A (Bovine), 6.5 % E (Canine) and 3.2 % from non specific hosts. Herd size represented a risk factor associated to *S. aureus* frequency, especially when the herd was larger than 13 cows (OR=5.63, CI<sub>95%</sub> 1.72 to 18.21). In the family dairy herds there was a high prevalence of subclinical mastitis associated to the infection produced by *S. aureus* Biotypes C and A, considered important in public health.

**KEY WORDS:** Bovine mastitis, Family dairy herds, *Staphylococcus aureus*, Biotypes, Public health.

Recibido el 17 de diciembre de 2010. Aceptado el 2 de julio de 2011.

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Km. 15.5 50200 Carretera Toluca-Atlaconulco, México. Tel. 72 22 96 5555, Fax 72 22 96 89 80. hanna1505@yahoo.com.mx Correspondencia al primer autor.

En México la producción lechera se concentra principalmente en las regiones templada y semiárida, donde se identifican sistemas de lechería especializada, familiar y de doble propósito, definidos por el nivel de tecnificación y uso de los recursos de producción<sup>(1)</sup>.

La lechería especializada se localiza principalmente en el norte de México, con sistemas de producción que aportan el mayor volumen de la producción nacional. Son altamente tecnificadas, mecanizadas en la producción de forrajes, en el ordeño y manejo de la leche<sup>(2)</sup>.

La lechería de doble propósito localizada en las regiones tropicales se caracteriza por una producción estacional. El manejo del ganado y su alimentación se basan en el pastoreo en praderas de gramíneas nativas y pastizales inducidos, y la dieta se complementa con subproductos agrícolas. En este sistema de producción los costos de alimentación disminuyen por el pastoreo<sup>(3)</sup>.

La lechería familiar es el sistema de producción predominante en México, localizada principalmente en la región central del país, en unidades de producción a pequeña escala manejadas por la familia. La alimentación del ganado está basada en el pastoreo en pequeñas superficies agrícolas con pastos nativos, forrajes y esquilmos suministrados en el pesebre<sup>(4)</sup>. El sistema depende de hatos estabulados y semi-estabulados en los que predomina la raza Holstein y las cruizas con la raza criolla<sup>(5)</sup>. El nivel de tecnificación y uso de insumos para la producción es limitado, con un manejo tradicional del hato y generalmente el ordeño es realizado de forma manual<sup>(6)</sup>. La venta local de leche y los productos lácteos elaborados domésticamente generan ingresos adicionales a la familia, aunados a otras actividades agrícolas y de jornal. En el Valle de Toluca prevalece el sistema de producción lechera de tipo familiar, el cual es considerado una actividad relevante que favorece el empleo de la familia y el desarrollo regional<sup>(4)</sup>.

En las vacas el nivel de infección de la glándula mamaria por *S. aureus* en el hato, depende de la prevalencia en la población y la dinámica de la

In Mexico milk production is concentrated mainly on temperate and semi-arid regions, where specialized, family dairy and dual purpose systems are present, defined by their level of technology and use of production resources<sup>(1)</sup>. Specialized dairies are located mainly in northern Mexico, with production systems that provide the bulk of national production. They are highly technological, machined in the production of feed, milking and milk handling<sup>(2)</sup>.

Dual purpose dairies are located in the tropical areas, and characterized by seasonal production; livestock management and feeding are based on grazing on native grass and induced pastures, and diet is supplemented by agricultural by-products. In this production system feeding costs decrease because of grazing<sup>(3)</sup>.

The family dairy farm is the dominant production system in Mexico, located primarily in the Midwest, in small scale units run by the family. Livestock feed is based on grazing in small agricultural areas with native grasses, forage and agricultural by-products<sup>(4)</sup>. The system relies on confined and semi-confined herds, with predominantly Holstein and crosses with the Creole breed<sup>(5)</sup>. The level of technology and use of production inputs is limited, with a traditional herd management and hand milking<sup>(6)</sup>. The local sale of milk and milk products domestically produced generates additional income to the families combined with labor journals and other agricultural activities. In the Valley of Toluca the family-type dairy farming system prevails, which is considered a relevant activity that promotes family labor as well as regional development<sup>(4)</sup>.

In cows, the level of mammary gland infection caused by *S. aureus* depends on herd prevalence according to the population dynamics of the infection, associated to its specific virulence factors<sup>(7)</sup>. The phenotypic characterization of *S. aureus* according to the biotype presumptively identifies the strains' origin<sup>(8)</sup>.

In small-scale dairy farms, hygiene and health management are often poor; situation that contributes to the development of mastitis, disease of health

infección asociada con los factores de virulencia propios del agente<sup>(7)</sup>. La caracterización fenotípica de *S. aureus* por medio del biotipo permite identificar el origen presuntivo de las cepas<sup>(8)</sup>.

En los hatos lecheros a pequeña escala, las condiciones de higiene y el manejo sanitario frecuentemente son deficientes; esta situación contribuye al desarrollo de la mastitis, enfermedad de gran importancia sanitaria y económica en la producción lechera<sup>(9)</sup>. La mastitis afecta considerablemente la salud de la glándula mamaria y la calidad sanitaria de la leche, representando un riesgo potencial a la salud pública por la posible contaminación de la leche y sus productos por cepas de *S. aureus* de origen animal<sup>(10)</sup>.

El presente estudio se realizó para determinar la presencia de mastitis subclínica, la frecuencia de infección de *S. aureus* y los biotipos presentes en los hatos lecheros de producción familiar en la región centro-este del Estado de México, que comprende los municipios de Chapultepec, Mexicaltzingo, Santa María Rayón, San Antonio la Isla y Tenango de Valle, con un clima templado sub-húmedo C(w2)(w)b(I)g de la clasificación de Koeppen<sup>(11)</sup>.

La población lechera de los hatos se caracterizó a partir de los datos obtenidos al aplicar una encuesta cerrada para determinar el tamaño de hato, el tipo de ordeño y la asociación de la prevalencia de mastitis clínica y subclínica, con la infección por *S. aureus* y sus biotipos.

Se realizó un estudio trasversal con un muestreo aleatorio en 26 hatos, de donde se obtuvieron 269 muestras de leche de vacas en línea de ordeño, previo consentimiento del productor. Las muestras de leche se obtuvieron con el procedimiento establecido por el National Mastitis Council<sup>(12)</sup> mediante ordeño manual de los cuatro cuartos glandulares, depositando aproximadamente 25 ml de leche en tubos estériles de vidrio conservados a 4 °C, durante su transporte para su análisis bacteriológico en el laboratorio. El criterio de inclusión de los animales muestreados fue el siguiente: vacas en producción de hatos a pequeña

concern and major economic importance in dairy cattle production<sup>(9)</sup>. Mastitis significantly affects the health of the mammary gland and the sanitary quality of the milk, representing a potential risk to public health caused by the contamination of milk and dairy products by *S. aureus* strains of animal origin<sup>(10)</sup>.

The present study was undertaken to determine the presence of subclinical mastitis, the frequency of *S. aureus* infection and biotypes present in dairy farms of household production in the Central - Eastern State of Mexico, which includes the municipalities of Chapultepec, Mexicaltzingo, Santa María Rayón, San Antonio la Isla and Tenango Valley, with a temperate sub-humid climate C(w2)(w)(b)(I) g according to Koeppen's classification<sup>(11)</sup>.

Dairy farms were characterized according to the data obtained by applying a closed survey to determine herd size, type of milking and the association of the prevalence of clinical and subclinical mastitis with *S. aureus* infection and their biotypes.

A transversal study with random sampling was conducted in 26 herds, from which 269 milk samples were obtained from cows online, with the producer's consent. Milk samples were collected according to the procedures established by the National Mastitis Council<sup>(12)</sup> by-hand milking of the four quarters of the mammary gland, depositing approximately 25 ml of milk in sterile glass test tubes, kept at 4 °C during transportation to undertake bacteriological analysis in the laboratory. The criterion of animals sampled was as follows: cows from small scale production farms and no apparent signs of mastitis<sup>(13)</sup>.

The diagnosis of mastitis was performed by using California test<sup>(14)</sup>; the reaction of the test to the sample of milk gland quarters was performed in an ordinal scale (0= there is no reaction, 1= reaction traces, 2= reaction one, 3= reaction two and 4= reaction three).

Bacteriological isolation was performed by inoculation of 0.010 ml of milk on agar blood plates and mannitol salt agar, incubated at 37 °C

escala de producción y sin signos aparentes de mastitis en los hatos<sup>(13)</sup>.

El diagnóstico de mastitis se realizó mediante la prueba de California con la técnica descrita por Blowey<sup>(14)</sup>, la reacción a la prueba en la muestra de leche de los cuartos glandulares fue interpretada en una escala ordinal (0=no hay reacción, 1=reacción trazas, 2=reacción uno, 3=reacción dos y 4= reacción tres).

El aislamiento bacteriológico se realizó inoculando 0.010 ml de leche sobre placas de agar sangre y manitol sal agar, incubadas a 37 °C en aerobiosis durante 24 h. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se identificaron mediante los procedimientos bacteriológicos descritos por el National Mastitis Council<sup>(12)</sup> para identificar el *S. aureus*; se observó el tipo de hemólisis sobre las placas de agar sangre, se realizó la tinción de Gram, las pruebas de catalasa y coagulasa en tubo efectuada con plasma humano y de bovino, Voges Proskauer y caldo nitrato<sup>(15)</sup>; la fermentación anaerobia de manitol y aerobia de la maltosa<sup>(16)</sup>. Se emplearon las cepas de *S.aureus* ATCC25923 y *S.epidermidis* ATCC 12228 como testigo del análisis bacteriológico.

La determinación de los biotipos de *S. aureus* se efectuó sobre placas de agar cristal violeta (agar tripticasa soya adicionado con cristal violeta 1:100,000), en consideración al sistema simplificado<sup>(8,17)</sup>, al observar la producción de estafilocinasa, tipo de hemólisis de las UFC en agar sangre preparado con eritrocitos de ovino y la coagulación del plasma de bovino en tubo, y la reacción positiva al cristal violeta de las UFC consistente en una coloración morada y un halo ligeramente amarillo sobre las placas de agar después incubar a 37 °C durante 24 h<sup>(17)</sup>. Posteriormente se observaron las características de crecimiento y los cambios de coloración de las UFC. La identificación de los biotipos estableció un origen presuntivo de las cepas<sup>(17,18)</sup>: A de humano, coagularon el plasma humano y las UFC mostraron una coloración violeta con un ligero halo amarillento; C de bovino, coagularon plasma humano y de bovino, las UFC se observaron de color crema, la reacción al cristal violeta fue

in aerobiosis durante 24 h. Unit forming colonies (UFC) were identified by bacteriological procedures described by the National Mastitis Council<sup>(12)</sup> to identify *S. aureus*; the kind of hemolysis was observed on blood agar plates; Gram staining was performed; catalase and coagulase tests were made with human and bovine plasma, Voges Proskauer and broth nitrate<sup>(15)</sup>; aerobic maltose<sup>(16)</sup> and anaerobic mannitol fermentation. *S. aureus* ATCC25923 and *S. epidermidis* ATCC 12228 strains were used as bacteriological controls.

The determination of *S. aureus* biotypes was carried out on violet cristal agar plates (tripticase soy agar added with violet cristal 1:100,000), according to the simplified system<sup>(8,17)</sup>, by observation of staphylokinase production, type of UFC hemolysis on blood agar prepared with sheep red blood cells and clotting of bovine plasma in test tubes, and UFC positive reaction to violet cristal consisting of a purple coloration and a slightly yellow enveloping halo on the agar plates, after incubation at 37 °C during 24 h<sup>(17)</sup>. Growth characteristics and changes in UFC coloration were subsequently observed; the identification of biotypes established the presumptive source of the strains<sup>(17,18)</sup>: A (human), clotted human plasma and the UFC showed a violet coloration with a light yellowish halo; C (beef), clotted human and bovine plasma, the UFC were creamy, negative violet cristal reaction; and E (canine), produced white UFC.

The data obtained were presented using frequency tables and graphs, and analyzed through the hypothesis test for proportions. The frequency of subclinical and clinical mastitis was obtained by analyzing the California test results in association with *S. aureus* infection and its 95 % confidence interval. Risk was assessed by Odds Ratio (OR, CI<sub>95%</sub>)<sup>(19)</sup>.

In the production units studied, 66.7 % had a mechanical milking system and an average herd size of 11.2 cows in the milking line, with an average yield of 10.76 L/cow per day. From the 269 cows sampled, the frequency of subclinical mastitis was 48.3 % (CI<sub>95</sub> % 42.22 to 54.47) and 6.1 % for clinical mastitis (CI<sub>95</sub> % 3.44 to 9.48). Table 1 shows the distribution of *S. aureus* isolates

Cuadro 1. Aislamientos de *Staphylococcus aureus* en hatos de producción lechera familiar en la zona centro-este del Estado de MéxicoTable 1. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy family herds of the Central - Eastern area of the State of Mexico

Herd size	Number of herds	Number of cows	<i>S.aureus</i> isolations		OR	CI <sub>95%</sub>	P
			n	%			
1- 6	7	41	3	7.3 <sup>a</sup>	0.23	0.05-0.8	
7-12	12	111	23	20.7 <sup>ab</sup>	3.31	0.091-10.91	0.051
13-18	7	117	36	30.7 <sup>b</sup>	5.65	1.72-18.21	0.002
Total	26	269	62	23.0			

ab Values with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

negativa; y E de canino, produjo UFC de color blanco.

Los datos obtenidos, se analizaron a partir de cuadros y gráficas de frecuencia para el análisis de prueba de hipótesis de proporciones. La frecuencia de mastitis subclínica y clínica se obtuvo al analizar los resultados de la prueba de California en asociación con la infección de *S. aureus* y su intervalo de confianza al 95 %. El riesgo se estimó por medio de la Razón de Momios (OR, IC<sub>95%</sub>)<sup>(19)</sup>.

En las unidades de producción estudiadas, el 66.7 % tuvieron un sistema de ordeño mecánico y el tamaño de hato promedio fue de 11.2 vacas en línea de ordeño, con una producción media de 10.76 L/vaca al día. De las 269 vacas muestreadas, la frecuencia de mastitis subclínica fue del 48.3 % (IC<sub>95%</sub> 42.22 a 54.47) y de mastitis clínica del 6.1 % (IC<sub>95%</sub> 3.44 a 9.48). El cuadro 1 muestra la distribución de aislamientos de *S. aureus* por tamaño de hato. La mayor frecuencia de infección (30.7 %) (OR=5.63, IC<sub>95%</sub> 1.72 a 18.21) se obtuvo en los hatos con una población entre 13 y 18 vacas. La tasa de positividad específica de *S. aureus* fue 23.04 %, predominante sobre la frecuencia decreciente de aislamiento de otros agentes; *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Streptococcus* spp, *Escherichia coli* y otros organismos coliformes.

La frecuencia de cuartos negativos al aislamiento bacteriológico fue del 47.20 %. Los biotipos de *S.*

by herd size. The highest frequency of infection (30.7 %) (OR = 5.63, CI<sub>95%</sub> 1.72 to 18.21) was obtained in herds with a population in between 13 and 18 cows. The *S. aureus* specific positivity rate was 23.04 %, predominantly over the decreasing frequency of isolation of other agents; negative coagulase *Staphylococcus*, *Streptococcus* spp, *Escherichia coli* and other coliform organisms.

The frequency of negative quarters to bacteriological isolation was 47.2 %. *S. aureus* biotypes identified were different in frequency; 79 % corresponded to biotype A, 11.3 % to biotype C, 6.5 % to biotype E, and 3.2 % were considered as nonspecific hosts (Table 2). The distribution of the identified biotypes

Cuadro 2. Distribución de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas de hatos de producción lechera familiarTable 2. *Staphylococcus aureus* biotype distribution in dairy cow family herds

Biotypes	Presumptive hostage	<i>S. aureus</i> isolations	
		n	%
A	Human	49	79.0 <sup>a</sup>
C	Bovine	7	11.3 <sup>b</sup>
E	Canine	4	6.5 <sup>bc</sup>
NE	—	2	3.2 <sup>c</sup>
Total		62	100

NE= Non especific.

abc Values with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

*aureus* identificados fueron diferentes en su frecuencia; el 79 % correspondieron al biotipo A, el 11.3 % al biotipo C, el 6.5 % al biotipo E y el 3.2 % se consideraron como hospederos no específicos (Cuadro 2). La distribución de los biotipos identificados en los hatos (Cuadro 3) mostró diferencias con respecto al sistema de ordeño empleado. El biotipo C se consideró predominante en las vacas evaluadas.

En el presente estudio se estimó un nivel de producción promedio en línea de ordeño de 10.76 L/vaca y un tamaño de hato no mayor a 30 vacas semejante al informado en otros trabajos<sup>(20)</sup>. En los hatos evaluados se observó un predominio del sistema de ordeño mecánico realizado con pequeñas unidades portátiles. Es posible que esta situación incremente el riesgo de infección en la glándula mamaria, y el desarrollo de la mastitis por agentes patógenos de tipo contagioso y ambiental, como *S. aureus* y la *E. coli*, que pueden estar presentes en el hato al momento del ordeño. Se ha observado que en hatos pequeños existe una mayor prevalencia de mastitis subclínica, cuando los animales son ordeñados mecánicamente comparados con los que se ordeñan manualmente<sup>(21)</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que la mala higiene durante el ordeño contribuye significativamente al desarrollo de infección intraglandular mamaria por *S. aureus* y otros agentes de importancia clínica en la mastitis<sup>(22)</sup>.

El nivel de infección por *S. aureus* mostró una frecuencia similar a la estimada en estudios realizados en otros países<sup>(23)</sup>. La frecuencia de

in herds (Table 3) showed differences according to the milking system used. Biotype C was predominantly found in sampled cows.

The estimated average milk yield in this study is similar to other reports, with 10.76 L/cow in line and a size of not more than 30 heads<sup>(21)</sup>. In the evaluated herds a predominance of the mechanized milking system made with small portable units was observed. It is possible that this situation increases the risk of infection in the mammary gland, and the development of contagious and environmental mastitis by pathogens such as *S. aureus* and *E. coli*, which may be present in the herd at milking time. It has been observed in small herds that there is a higher prevalence of subclinical mastitis when the animals are mechanically milked in comparison to those manually milked<sup>(22)</sup>. However, it has been shown that poor milking hygiene significantly contributes to the development of intraglandular mammary *S. aureus* infection and by other agents of clinical importance in mastitis<sup>(23)</sup>.

The *S. aureus* level of infection showed a frequency similar to that assessed in studies conducted in other countries<sup>(24)</sup>. The frequency of subclinical mastitis was elevated and related to the high rate of *S. aureus* infection, situation that compromises the health of the mammary gland, and generates significant economic loss and risks to animal health and milk safety, indicating the urgent need to implement prevention and mastitis control programs<sup>(25,26)</sup>, because of the clinical significance *S. aureus* infection, in carrier cows bearing glandular infection by strains with virulence factors

Cuadro 3. Biotipos de *Staphylococcus aureus* en los sistemas de ordeño en vacas de hatos de producción lechera familiar

Table 3. *Staphylococcus aureus* biotypes according to the milking cow system

Milking type	Herds (n)	Cows (n)	S. aureus isolations		Biotype frequency			
			n	%	A	C	E	NE
By hand	9	51	9	17.6	0	7	0	0
Mechanized	17	218	53	24.3	7	42	4	2
Total	26	269	62	23.0	7	49	4	2

A= human, C= bovine, E= canine, NE= non especificed. (P>0.05).

mastitis subclínica determinada fue elevada relacionada con la alta tasa de infección por *S. aureus*, situación que compromete la salud de la glándula mamaria, además de generar pérdidas económicas importantes y riesgos a la salud animal e inocuidad alimentaria de la leche, indicando la urgente necesidad de implementar programas de prevención y control de la mastitis<sup>(24,25)</sup>, debido a la importancia clínica de la infección por *S. aureus*, en las vacas portadoras de la infección glandular por cepas con factores de virulencia capaces de comprometer seriamente la salud de la glándula mamaria y la salud pública<sup>(26)</sup>.

La caracterización fenotípica de los biotipos del *S. aureus* permitió identificar el origen presuntivo de las cepas consideradas; de origen humano, bovino y canino, que tienden a explicar la dinámica de la infección, resaltando la importancia epidemiológica del biotipo C, el cual puede estar involucrado en la infección cruzada entre las vacas lecheras y el hombre. Es posible que la contaminación de la leche y sus derivados pueda contribuir a la diseminación del agente entre la población humana, al ingerir leche no pasteurizada y productos lácteos elaborados sin adecuadas prácticas de higiene<sup>(27,28)</sup>. La contaminación de la leche puede ocurrir a través de la infección de la glándula mamaria, los utensilios y el equipo de ordeño<sup>(29)</sup>.

Los biotipos de *S. aureus* sugieren una variación importante entre las cepas relacionadas con ecovares presentes en la zona estudiada<sup>(18)</sup>, asociados a los factores de virulencia de las cepas; esta variación puede ser evaluada mediante el gen de la coagulasa, que facilita la determinación de la variación genética entre las cepas de *S. aureus* en una región geográfica en la cual se observa una predominancia de ciertos genotipos, relacionados con el aumento en la virulencia de *S. aureus*<sup>(30)</sup>.

El biotipo C de *S. aureus* predominante denota su importancia para la salud pública, debido a que este biotipo también se ha detectado en carne procedente de mercados de Bélgica, en donde se determinó un alto porcentaje del biotipo en las cepas de *S. aureus* identificadas<sup>(31)</sup>. En otros trabajos relacionados, se menciona que los

which can seriously compromise the mammary gland and public health<sup>(27)</sup>.

The phenotypic characterization of *S. aureus* biotypes identified the presumptive origin of strains: human, bovine and canine, which tend to explain the dynamics of the infection, highlighting the epidemiological importance of type C, which may be involved in cross-infections among dairy cows and humans. It is possible that the contamination of milk and its by-products may contribute to the spread of the agent in the human population ingesting unpasteurized milk and dairy products without adequate hygiene practices<sup>(28,29)</sup>. Milk contamination can occur through infection of the mammary gland, utensils and the milking equipment<sup>(30)</sup>. *S. aureus* biotypes suggest a significant variation among strains related to ecovars in the studied area<sup>(18)</sup>, associated with virulence factors of the strains. This variation can be assessed by the coagulase gene, which eases the genetic variation among *S. aureus* strains in a geographical region, in which there is a predominance of certain genotypes, related to the increase in the *S. aureus* virulence<sup>(31)</sup>.

The predominant *S. aureus* biotype C, denotes its public health importance, because this type has also been detected in meat from markets in Belgium<sup>(32)</sup>. In other related studies, it is mentioned that *S. aureus* isolates from animal origin tends to be less enterotoxigenic when compared to the human origin strains<sup>(33)</sup>. The latter has a tendency to produce large quantities of protein A and alpha toxin, which substantially increases the risk to human population when epidemic strains of *S. aureus* are identified<sup>(34,35)</sup>.

It is likely that the increased frequency of the biotype C present in the cow population studied, was due either to inadequate handling or to milking hygiene. According to the literature this situation favors a human-cow cross-infection, and shows that man is a potential source of *S. aureus* in the occurrence of dairy cattle intramammary infections<sup>(36)</sup>. Other studies using molecular biology techniques in isolated strains from human patients and milk from cattle with mastitis, shows that the source of *S.*

aislamientos de *S. aureus* de origen animal tienden a ser menos enterotoxigénicos comparados con las cepas de origen humano<sup>(32)</sup>. En estas últimas se observa generalmente una tendencia a producir cantidades importantes de Proteína A y alfa toxina, que incrementan notablemente el peligro para la población humana al detectar cepas de *S. aureus* de tipo epidémico<sup>(33,34)</sup>.

Es probable que la mayor frecuencia del biotipo C presente en la población de las vacas estudiadas, sea debido a prácticas inadecuadas en el manejo e higiene del ordeño; esta situación de acuerdo con la literatura favorece una infección cruzada hombre-vaca, al indicar que el hombre es una fuente potencial de *S. aureus* para la ocurrencia de infecciones intramamarias en el ganado lechero<sup>(35)</sup>. En otros estudios utilizando técnicas de biología molecular en cepas aisladas de pacientes humanos y de leche de bovinos con mastitis, se indica que la fuente de las cepas de *S. aureus* difiere entre los reservorios identificados en humanos y bovinos, al representar dos subpoblaciones separadas raramente presentes en infecciones cruzadas<sup>(36)</sup>. Sin embargo, otros autores coinciden señalando que pueden ocurrir frecuentemente infecciones entre las vacas y el hombre en los hatos lecheros<sup>(37,38)</sup>.

El riesgo epidemiológico de infección por *S. aureus* para el hombre, se puede incrementar si consideramos que la leche y sus derivados son una parte importante en la nutrición del humano<sup>(39)</sup>; la transferencia de *S. aureus* entre las vacas y el hombre puede dar como resultado un problema serio de salud pública, por el desarrollo de infecciones de origen alimentario por cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas que afecten la inocuidad y calidad de la leche, así como el creciente incremento de la resistencia a los antibióticos al *S. aureus* en las vacas lecheras, particularmente al observar cepas resistentes a oxacilina y meticilina (ORSA/MRSA), y multi-resistencia a los antibióticos. El *S. aureus* de origen bovino puede contribuir a incrementar la presión de infección humana por cepas MRSA y las resistentes a fluoroquinolonas<sup>(40,41,42)</sup>.

En los hatos de producción lechera familiar estudiados en la región centro-este del estado de México; existe una alta tasa de positividad de *S.*

*aureus* strains differ among the identified reservoirs in humans and cattle, representing two separated subpopulations, and rarely present in cross infections<sup>(37)</sup>. However, other authors agree in stating that infections may frequently occur between cows and man in dairy farms<sup>(38,39)</sup>.

The epidemiological risk of infection by *S. aureus* to man, can be increased if we consider that milk and dairy products are an important part in human nutrition<sup>(40)</sup>; transfer of *S. aureus* between cows and man can result in a serious public health problem, because of the development of food-borne infections by *S. aureus* strains producing enterotoxins that affect safety and quality of the milk, and also the recent increase in antibiotic resistance, particularly in strains resistant to oxacillin and methicillin (ORSA/MRSA), and multi-resistant to antibiotics. *S. aureus* of bovine origin can contribute to increase the pressure of human infection by MRSA resistant strains to fluoroquinolones<sup>(41,42,43)</sup>.

In the family dairy farms studied in the Central - Eastern State of Mexico, there is a high rate of *S. aureus* positivity biotypes C and A, regarded as human and cattle in origin, associated with the presentation of subclinical mastitis in dairy cows.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) which awarded grant # 212841 to Ana María Manjarrez Lopez to pursue her Masters studies in the Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM); as well as the dairy farmers who contributed to the study.

*End of english version*

---

---

*aureus* biotypes C y A considerados de origen humano y de bovino, asociados con la presentación de mastitis subclínica en las vacas lecheras.



**AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca # 212841 otorgada a Ana María Manjarrez López para cursar los estudios de Maestría. A los productores lecheros que contribuyeron en la realización del estudio.

**LITERATURA CITADA**

- Antúnes PC. La ganadería lechera mexicana. Situación actual y necesidades de investigación. Instituto de recursos genéticos y productividad. Especialidad Ganadera. Colegio de posgraduados en Ciencias Agrícolas. (Edición económica). Montecillo, Texcoco, México; 2000.
- Cuevas OS. Situación y perspectivas de la producción intensiva de leche. En: Cavalloti VB, Hernández MM, Reyes CR editores. Ganadería, Sustentabilidad y Desarrollo rural. 1st ed. México: Impresos América; 2005.
- Martínez BE, Salas QH. Globalización e integración en la producción y desarrollo tecnológico de la lechería mexicana. 1st ed. México: Miguel Ángel Porrúa; 2002.
- Bernal ML, Rojas GM, Vázquez FC, Espinoza OA, Estrada FJ, Castelán OO. Determinación de la calidad físico-química de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del estado de México. *Vet Méx* 2007;38(4):395-407.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Situación actual y perspectivas de la producción de la leche en México. Edición económica. México; 2001.
- FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. Oportunidades de desarrollo de la leche en México. Boletín informativo. No. 294. Vol. XXIX. México. 1997.
- Velázquez OV. Establecimiento de un programa de monitoreo en mastitis en un hato lechero del Valle de Toluca. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Documento básico. 1985;16:143-146.
- Devriese LA. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J Appl Bacteriol* 1984;56(2):215-220.
- Manjarrez LAM, Velázquez OV, Alonso MU, Díaz ZS, Lagunas BS, Valladares CB, Saltijeral OJ. Niveles de infección producidos por *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros del Estado de México [resumen]. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México. 2008.
- Velázquez OV, Lagunas BS, Gutiérrez GB, Talavera RM, Alonso FM, Saltijeral OJ. *Staphylococcus aureus* methicillin resistant strain (MRSA) minimum inhibitory enrofloxacin concentration in *Staphylococcus aureus* isolations obtained from cows with subclinical mastitis in family dairy farms [abstract]. Inter Soc Anim Hygiene Cong. ISAH - Warsaw, Poland. 2005;1:338.
- Álvarez JR. Enciclopedia de México. Tomos II, VI y IX. Compañía editora de Enciclopedias de México, Secretaría de Educación Pública. México. 1988.
- NMS. National Mastitis Council. Laboratory handbook on Bovine Mastitis. Madison, USA: National Mastitis Council Inc; 2005.
- Arriaga CJ, Albarran PB, García MA, Espinoza OA, Castelán OO. Investigación y desarrollo participativo de estrategias de alimentación apropiadas para sistemas de producción de leche en pequeña escala. 6º coloquio de investigación. Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. 2000.
- Blöwey RP, Edmonson P. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche: Guía práctica ilustrada. 3ª ed. Zaragoza, España: Editorial Acirbia; 1995.
- Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *J Clin Microbiol* 2003;(41):767-771.
- Cohen G. Microbiología y Biología molecular. 2nd ed. Barcelona, España: Colección Métodos. 1977.
- Cottral GE. Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria. 4ª ed. México: Prensa Médica Mexicana; 1978.
- Devriese LA. Staphylococci in healthy and diseased animals. *J Appl Bacteriol* 1990;71S:80S.
- Steel RGD, Torrie JH. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2ª ed. México: McGraw-Hill; 1990.
- Wiggins S, Tzintuzn RR, Ramírez GM, Ramírez GR, Ramírez VJ, Ortiz UG, Pina CB, et al. Costos y retornos de la producción en pequeña escala en la zona central de México. La lechería como empresa. Cuarta época, México; 2001.
- Faría RJ, García UA, D'Pool G, Valero LK, Allara CM, Angelosante G. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos de doble propósito ordeñados de forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. *Revista Científica* 2005;15(2):109-118.
- Ávila TS, Gutiérrez CA. Comparación del estado de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. *Vet Méx* 2002;33:387-394.
- Seegers H, Fourichon C, Beaudeau, F. Production effects related to mastitis economics in dairy cattle herds. *J Vet Res* 2003;(34):475-491.
- Velázquez VO, Vázquez CJ, Pescador SN, Saltijeral OJ. Nivel de células somáticas en leche y resistencia de las vacas lecheras a la mastitis. *Rev Prod Anim* 2005;20(207):15-23.
- Zecconi A, Piccini R, Fox LK. Epidemiological study of noncontagious intramammary infections in nine commercial dairy herds following a *Staphylococcus aureus* control program. *J Vet Med B* 2004;51:333-336.
- Jaramillo JA, Barajas RJ, Velázquez, OV. Factores de riesgo asociados a infecciones subclínicas producidas por los biotipos humano y bovino de *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria de vacas en lactancia. *Rev Vet Zoot de Caldas*. 1999;11(1):14-18.
- Dimitracopoulou G, Sakellariou C, Papavassiliou J. Animal fecal carriage and biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 1977;34(5):461-464.
- Kivaria FM, Noordhuizen JP, Kapaga GM. Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 2006;38:185-194.
- Fagundes H, Fernández OC. Infecções intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciencia Rural, Brasil*; 2004;34(004):1315-1320.
- Omega R, Deighton M, Capstick J, Gerraty N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol* 1999;66(4):275-84.

31. Isigidi BK, Mathieu A-M, Devriese LA, Godard C, Van Hoof J. Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants. *J Appl Bacteriol* 1992;(72):16-20.
32. Yasser H, Al-Tarazi, Albetar MA, Alaboudi AR. Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Res Intl* 2009;(42):374-379.
33. Isigidi BK, Devriese LA, Godard C, Van Hoof J. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett Appl Microbiol* 1990;(1):145-147.
34. Velázquez OV, Saltijeral JO, Alonso FMU, Lagunas BS, Enríquez E. Phenotypical expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors isolated from dairy cows with subclinical mastitis. *Int Soc Anim Hygiene. Saint-Malo, France.*2004;1:397-398.
35. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Tikofsky LG, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res.* 2003;(34)579-596.
36. Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol* 1999;67(2):127-41.
37. Karahan M, Cetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *J Vet* 2007;174(2):428-31.
38. Trovó F, Lemos MV, Givisiez PE. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of human and animal *Staphylococcus aureus* isolates from dairy farms with manual milking. *Vet Microbiol.*2005;109(1-2):57-63.
39. Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Nishimori K, Uchida I, Higashide M, *et al.* Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. *J Dairy Sci* 2008;(91):564-569.
40. Lagunas BS, Velázquez VO, Vázquez CJ. Detection of the mec A gene in strains of *Staphylococcus aureus* methicillin resistant isolated from milk samples of dairy cows through the polymerase chain reaction (PCR). *Int Soc Anim Hygiene. Int Cong Anim Hygiene. México.* 2003;1:189-192.
41. López JM, Higuera RJ, Ochoa ZA, Chassin NO, Valdez AJ, Bravo PA, Baizabal AB. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán, México. *Téc Pecu Mex* 2006;44(1):96-106.
42. Loh JV, Percival SL, Woods EJ, Williams NJ. Christine A Cochrane Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *Int Wound J* 2009;6(1):32-38.