

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2020; 10:1-15 <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.21>
Artigo Original. Recebido: 13/02/2020. Aceito: 18/08/2020. Publicado: 26/10/2020. Chave:2020-12.

Variação genética de *Staphylococcus aureus* causando mastite em vacas leiteiras em Jalisco

Genetic variation of *Staphylococcus aureus* causing mastitis in dairy cows in Jalisco

Castañeda-Vázquez Hugo*¹ , Padilla-Ramírez Francisco² , Castañeda-Vázquez Martha¹ , Camacho-Palafox José¹ , Salas-Castañeda Erika¹ **

¹Universidad de Guadalajara, Laboratorio de Mastitis y diagnóstico Molecular. División de Ciencias Veterinarias, Guadalajara, México. ²Universidad de Guadalajara, Departamento de Producción Animal. División de Ciencias Veterinarias, Guadalajara, México. *Autor responsável: Castañeda-Vázquez Hugo. **Autor para correspondência: Padilla-Ramírez Francisco². Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Camino Ramón Padilla Sánchez #2100 Nextipac, 45200, Zapopan, Jalisco, 37771150 Ext. 33177. hcastane59@yahoo.com.mx, fjavier.padilla@academicos.udg.mx, arcoiris2565@hotmail.com, ertytres333@hotmail.com, erika.salas@cucba.udg.mx.

Resumo

Foi determinada a variabilidade genética das cepas de *S. aureus* isoladas de alguns casos de mastite bovina. 335 vacas foram amostradas em 27 estábulos em 10 municípios no estado de Jalisco. As cepas de *S. aureus* foram identificadas a partir de amostras de leite de cada glândula mamária de cada vaca, as quais foram cultivadas em ágar sangue e com base nas características da cultura, testes bioquímicos e finalmente sua confirmação molecular por PCR. A variação genética nas cepas identificadas foi obtida pela técnica de eletroforese de campo pulsado. As imagens dos géis foram analisadas no software Bionumerics®. O teste da Califórnia diagnosticou 2,26% de mastite clínica e 40,45% de mastite subclínica. Foi registrada uma frequência de aparecimento de *S. aureus* de 9,8% do total das glândulas amostradas. Foi observada uma variação genética de 14,9%. As 32 cepas analisadas foram agrupadas em pulsotipos com 95% ou mais de similaridade genética, resultando em 12 pulsotipos. Conclui-se que existe uma grande diversidade na variabilidade genética das cepas de *S. aureus* de diferentes estábulos do estado de Jalisco e uma grande similaridade genética das cepas dentro de cada baía.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, tipagem, frequência de mastite, variação genética, eletroforese de campo pulsado.

Abstract

The genetic variability of *S. aureus* strains isolated from some cases of bovine mastitis was determined. 335 cows from 27 stables were sampled in 10 municipalities in Jalisco state. *S. aureus* strains were identified from milk samples of each mammary gland of each cow, which were grown in blood agar and based on culture characteristics, biochemical tests, and finally their molecular confirmation by PCR. The genetic variation in the strains was identified by pulsed-field electrophoresis technique. The images of gels were analyzed using the Bionumerics® software. 2.26% of clinical mastitis and 40.45% of subclinical mastitis were diagnosed with the California test. An appearance *S. aureus* frequency of 9.8% of the total sampled glands was recorded. A genetic variation of 14.9% was observed. The 32 strains analyzed were grouped into pulsotypes with 95% or more of genetic similarity, resulting in 12 pulsotypes. It is concluded that there is great diversity in the genetic variability of *S. aureus* strains from different stables in Jalisco state and a great genetic similarity of strains within each stable.

Keywords: PFGE, *S. aureus*, typification, frequency of mastitis, genetic variation, pulsed field electrophoresis.

INTRODUÇÃO

A mastite é definida como a inflamação da glândula mamária, causada principalmente por patógenos (Bedolla *et al.*, 2008), que causa diminuição na produção e na qualidade do leite em sua forma subclínica; entretanto, pode se transformar em mastite clínica, podendo atingir os dejetos do animal devido à perda de funcionalidade da glândula mamária (Echeverri *et al.*, 2010). Da mesma forma, a mastite subclínica tende a estar presente por mais tempo e é mais frequente do que a mastite clínica (Bedolla *et al.*, 2007). As perdas econômicas podem chegar a cinco mil pesos para cada lactação duma vaca por ano (Van *et al.*, 2016). Embora cerca de 137 microrganismos tenham sido encontrados em bovinos leiteiros com mastite, apenas um pequeno número de patógenos é responsável pela maioria dos casos (Volter *et al.*, 2004); por exemplo, é o caso do gênero *Staphylococcus* spp, que expressa fatores de virulência que permitem sua persistência e distribuição no hospedeiro (Marqués *et al.*, 2013).

Por outro lado, *Staphylococcus aureus*, descrito pelo médico Alexander Ogston em 1880 (Cervantes-García *et al.*, 2014), que atualmente é considerado um dos principais agentes causadores de mastite em todo o mundo (El-Sayed, 2006b), com uma frequência de quase 30% das amostras de vacas com mastite (Calderón e Rodríguez, 2008). Propriedades invasivas e fatores extracelulares são atribuídos a esse patógeno, como a produção de toxinas que levam à síndrome do choque tóxico, toxinas esfoliativas e enterotoxinas estafilocócicas (Vasconcelos e Ribeiro de Souza, 2010). Além disso, possui grande capacidade de aquisição de elementos exógenos por transferência horizontal, o que permite sua fácil adaptação ao ambiente e aos agentes antimicrobianos, por meio da aquisição de fatores de resistência a antibióticos codificados por plasmídeos e transposons (Baba *et al.*, 2002).

A tipagem molecular de microrganismos (genotipagem) é muito importante para entender a evolução dos patógenos e estudar sua relação genética; desta forma, um maior entendimento é alcançado durante as investigações epidemiológicas (Amr El-Sayed, *et al.*, 2017; Castañeda *et al.*, 2018, García *et al.*, 2019). Existem vários métodos de genotipagem, cada técnica apresentando pontos fortes e fracos. Entre os mais proeminentes estão eletroforese de campo pulsado (PFGE), tipagem de gene spa, tipagem de sequência de locus múltiplos (MLST), análise de perfil de plasmídeo, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), análise (MLVA) e a análise de toda a sequência do genoma do DNA (Struelens *et al.*, 2009; Kuroda *et al.*, 2001).

Eletroforese de campo pulsado (PFGE) é uma poderosa técnica de genotipagem usada para separar grandes moléculas de DNA (DNA genômico completo), após macro-restrição (corte com uma enzima de restrição em vários pontos do genoma) e separação de fragmentos campo elétrico. Essa técnica é uma boa representação de todo o

cromossomo bacteriano, pois fornece fragmentos de DNA claramente diferenciados (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2016). Um dos pontos fortes da técnica é que ela possui um alto poder discriminatório (Struelens *et al.*, 2009). Castañeda *et al.*, (2011) mostraram uma estreita relação de cepas de campo de *S. aureus*, responsáveis pela mastite no oeste do México; sugerindo que clones intimamente relacionados de *S. aureus* são responsáveis pela maioria das infecções intramamárias, causadas no estado de Jalisco (Castañeda *et al.*, 2018). Marqués *et al.*, (2013) observaram no Brasil uma grande diversidade de clones de *S. aureus*, detectando seis diferentes perfis genéticos por meio de eletroforese de campo pulsado (PFGE). (Kuroda *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2017) encontraram variações genéticas de até 30% de 41 cepas de *S. aureus*, isoladas no Japão de vacas com mastite, humanos e em carnes destinadas à venda. (Can *et al.*, 2017), obteve uma variação em torno de 25% da totalidade das amostras obtidas em amostras de carnes, leite cru, queijo, carnes e frango na Turquia. As cepas obtidas a partir do leite de vaca cru apresentaram similaridade de 90%.

Somente uma investigação minuciosa nos ajudará a entender a epidemiologia do patógeno *S. aureus*, podendo auxiliar no controle da doença e/ou na produção de uma vacina, minimizando sua ameaça. Para tanto, várias ferramentas de biologia molecular foram desenvolvidas para uso em estudos epidemiológicos moleculares avançados, como as utilizadas na presente investigação de *S. aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem. Foi realizado um estudo transversal com amostragem aleatória em 27 estábulos pertencentes aos 10 municípios: Acatic, Arandas, Atotonilco el Alto, Encarnación de Díaz, La Barca, Lagos de Moreno, Tepatitlán de Morelos, San Juan de los Lagos, San Miguel el Alto e Tototlán, considerados os maiores produtores de leite do estado de Jalisco, México.

O número de animais amostrados foi proporcional à população de vacas de cada município, em uma proporção de aproximadamente 1 para 900. O tamanho dos estábulos foi classificado pelo número de vacas em produção, que no momento da amostragem cada baia possuía, e a partir disso foi determinado o número de vacas a serem amostradas em cada uma (Tabela 1). O número total de vacas a serem amostradas foi determinado com a fórmula utilizada para populações infinitas ou muito grandes (Gamboa, 2017), resultando em 335 vacas.

Deteção de mastite. O teste da Califórnia foi usado como um teste de campo para determinar a frequência de mastite subclínica. Foi realizada antes da ordenha do animal, após eliminação dos primeiros jatos de leite; tomar uma amostra de aproximadamente 2 mL e aplicar uma quantidade semelhante do reagente California Mastitis Test (CMT); Seguindo o procedimento proposto por (Barnum e Newbould, 1961), após alguns movimentos circulares da mistura, esta foi imediatamente interpretada.

Tabela 1. Classificação dos estábulos por tamanho (número de vacas em produção)

Tamanho do estábulo	Nº. vacas em produção	Nº. de vacas da amostra
Pequeno	≤ 25	≤ 11
Mediano	26 a 99	12 a 15
Grande	≥ 100	16 a 20

Cultura bacteriológica, testes bioquímicos, técnica de PCR; bem como a eletroforese de campo pulsado foram realizadas no laboratório de mastite e biologia molecular do Centro Universitário de Ciências Biológicas e Agrícolas (CUCBA) da Universidade de Guadalajara, localizado no município de Zapopan, no estado de Jalisco. As 1.325 amostras de leite foram cultivadas em placas de Petri, com teor de ágar sangue adicionado de 5% de sangue de ovelha, inoculando-se cerca de 0,01 mL de leite para cada amostra.

Identificação presuntiva de *S. aureus*. A identificação iniciou-se observando as características da colônia (presença e tipo de hemólise, cor e textura). Os seguintes 3 testes bioquímicos foram então realizados: teste da coagulase em tubo ([Sperber y Tatini., 1975](#)), teste do sal de manitol ([Cervantes-García et al., 2014](#)) e teste da DNase ([Menzies, 1977](#)).

Identificação molecular de *S. aureus*. Foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), uma vez que permite a identificação de patógenos proporcionando alta sensibilidade e especificidade, sendo o teste padrão ouro para identificação de espécies ([El-Sayed et al., 2017](#)).

Extração de DNA. Foi realizado o método de extração da lisostafina proposto por [Chapaval et al., \(2008\)](#), com algumas modificações. Das culturas de *S. aureus* semeadas em ágar sangue por 18-24 horas em incubação, 2 assados foram retirados e colocados em 200 µL de uma solução TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM), pH 8. Posteriormente, foi adicionado 2 µL de lisostafina (1 mg/mL) e incubado por 2 horas a 37 °C, 200 µL da mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25-24-1) foram adicionados, foi agitado em alta velocidade (3.000 rpm) em vórtice por 3 segundos e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos; 150 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo e 60 µL de NaCl 5 M e 300 µL de etanol 96% foram adicionados e a mistura foi colocada a -20 °C durante 2 h para precipitar o DNA. Posteriormente, foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado, tomando cuidado para não descartar o pellet formado. Em seguida, 200 µL de etanol 70% foram adicionados e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, descartando o etanol. Os tubos foram mantidos abertos em frente ao queimador

por 30 min para que os vestígios de etanol evaporassem. Finalmente, 50 µL de TE, pH 8, foram colocados.

Iniciadores e programa de PCR.

Os seguintes primers foram usados para a amplificação do gene 23 rDNA

Sequência 5 '(ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC)

Sequência 3 '(AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC)

E para a amplificação do gene foi utilizado o seguinte programa:

Etapas 1 (1 ciclo): passo 1. Desnaturação (94 °C por 5 min)

Etapas 2 (37 ciclos): etapa 1. Desnaturação (94 °C por 40 s)

Passo 2. Alinhamento (58 °C por 60 s)

Passo 3. Extensão (72 °C por 75 s)

Etapas 3 (1 ciclo): passo 1. Extensão (72 °C por 5 min) (El-Sayed *et al.*, 2006b).

Eletroforese. Para a eletroforese, um gel de agarose a 1% foi usado, que foi executado a 70 v por 40 min, usando o tampão TBE 1x (89 mM Tris - 89 mM Borato - 2 mM E.D.T.A), pH 8.

Determinação da variação genética. Foi utilizada a técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE), mesma técnica utilizada por Sato *et al.*, (2017), para determinar a variabilidade genética de *S. aureus*. Apenas as cepas com diagnóstico positivo para *S. aureus* por PCR foram consideradas para a determinação da variação genética. No total, 32 cepas de *S. aureus* foram selecionadas.

A técnica utilizada por Castañeda *et al.*, (2011) foi desenvolvida, com algumas modificações.

As cepas foram inoculadas em placas de ágar sangue e incubadas a 37 °C por 18 horas. De cada cepa bacteriana, uma enxada foi retirada da cultura e suspensa em 200 µL da solução de PIV (0,01 mM Tris, 1M NaCl) pH 8, e ajustada para uma densidade óptica de 1,5 com um nível de absorvância de 610 nm. Dessa solução, 60 µL de cada amostra foram retirados e misturados com 60 µL de agarose 1% (dissolvida em TE), mantida a uma temperatura de 45 °C. Posteriormente, foram transferidos para um compartimento da fôrma em bloco e aguardaram cerca de 15 minutos para que se solidificassem. Os blocos foram transferidos para um tubo de 1,5 mL contendo: 0,5 mL da solução de lise (Tris 6 mM - NaCl 1 M - EDTA 100 mM-desoxicolato de sódio 0,2%-sarcosil 0,5%), 25 µL de brij 58 (a 10%), 5 µL de lisozima (50 mg/mL) e 5 µL de lisostafina (1 mg/mL); foi misturado e incubado a 37 °C durante 21 horas. A solução foi decantada e substituída por 0,5 mL da solução ES (500 mM E.D.T.A - 1% sarcosil) e 25 µL de proteinase K (20 mg / mL) foram adicionados. Eles foram incubados a 56 °C por 21 h. A solução ES foi decantada e os blocos foram lavados 5 vezes, agitando suavemente durante 20 min com

10 mL de TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM) para cada lavagem. Uma fatia de 3 mm foi cortada de cada bloco.

Para a digestão, foram adicionados 100 µL da solução de restrição: 87,75 µL de água, 10 µL de tampão (10x), 1,25 µL de enzima *Sma*1 (12,5 U por amostra) e 1 µL de albumina de soro bovino (BSA). Deixou-se incubar durante 3 horas a 25 °C. Posteriormente, as fatias foram colocadas dentro de um gel de agarose a 1% em TBE 0,5x pH 8. A eletroforese foi realizada em 7 L 0,5x TBE pH 8 no aparelho Chef-DR II (Bio-Rad).

O programa utilizado foi: Tensão 6 V/cm, temperatura 14 °C; tempo inicial 5 s; tempo final 40 s; e duração de 21 h. Posteriormente, o gel foi corado e a imagem capturada em fotodocumentador.

A determinação da variação genética foi realizada por meio da análise das imagens dos géis, obtidas pela técnica de PFGE, a partir de dendrogramas para determinação do parentesco, com o auxílio do software Bionumerics® (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O coeficiente de correlação de Dice e o algoritmo de agrupamento de médias matemáticas de grupos de pares não ponderados (UPGMA) foram usados. Foi elaborado um dendrograma de similaridade do total das amostras e 3 outros dendrogramas (um para cada região amostrada). Os percentuais de similaridade genética puderam ser obtidos com a elaboração dos dendrogramas.

RESULTADOS

Frequência de mastite. Das 1.340 glândulas mamárias correspondentes às 335 vacas amostradas, os seguintes resultados foram obtidos. Analisando 1.325 glândulas mamárias funcionais e 15 glândulas cegas (não funcionais), foi observada uma frequência de 42,71% de mastites, sendo que a mastite clínica representou 2,26% e a mastite subclínica 40,45%.

Frequência de agentes etiológicos. Das 1.325 amostras coletadas do leite, um crescimento positivo de *S. aureus* foi obtido em 130 amostras (correspondendo a 9% do total) e um crescimento de 261 de estafilococos coagulase negativos (18% do total). Portanto, reflete a importância do gênero *Staphylococcus* spp, uma vez que representou um crescimento de 27% do total das amostras.

Variação genética de *S. aureus* pela técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE). Os seguintes perfis genéticos (pulsotipos) de 32 cepas representativas de *S. aureus* isoladas de estábulos foram obtidos usando a técnica de PFGE (Figura 1).

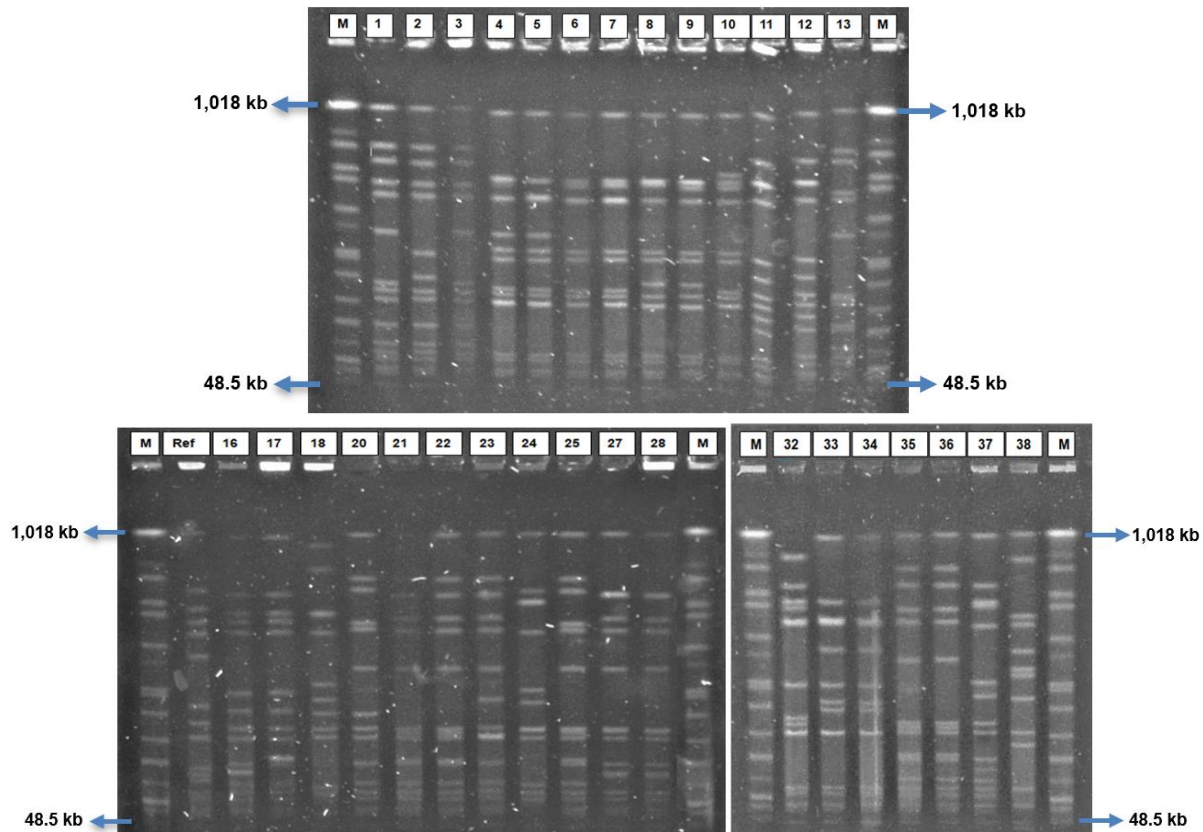


Figura 1. Eletroforese de campo pulsado do DNA (após digestão com a enzima de restrição *sma1*) das 32 cepas de *S. aureus* isoladas de vacas leiteiras no estado de Jalisco. Onde M = marcador de peso molecular de 48,5 kb a 1.018 kb (New England Biolabs), Ref = cepa de referência *S. aureus* (ATCC 25923) e número de 1 a 38 = o total de isolados (32).

Dendrogramas foram preparados para determinar a variação genética de *S. aureus*. Os 32 pulsotipos das cepas estudadas foram agrupados em 12 agrupamentos de pulsotipos diferentes, com 95% ou mais de similaridade genética dentro de cada grupo de pulsotipos.

Obteve-se um percentual de similaridade genética de 85,1%, o que corresponde a 14,9% da variação genética dos 32 pulsotipos de cepas isoladas, dos 10 municípios amostrados no estado de Jalisco. O agrupamento dos tipos de pulso (p3), foi o agrupamento mais encontrado 25% (8/32) do total dos pulsotipos das cepas analisadas (figura 2).

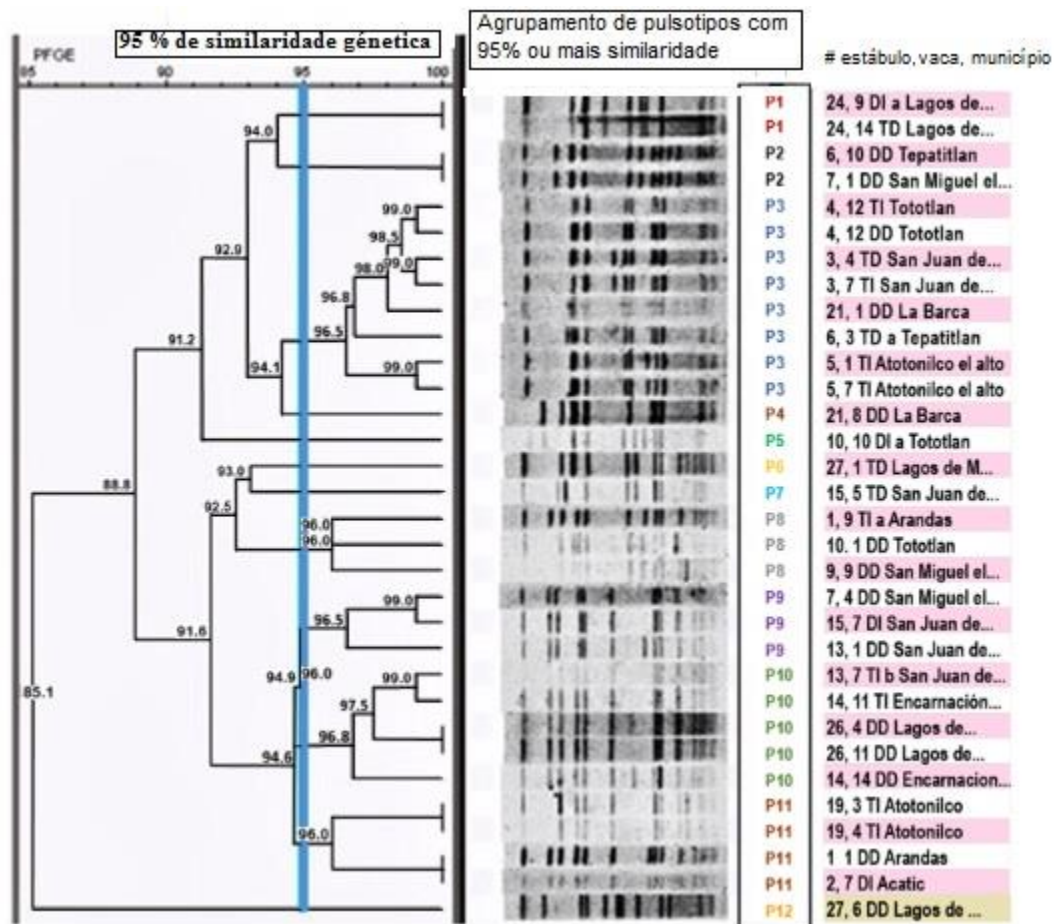


Figura 2. Dendrograma dos pulsotipos das 32 cepas de *S. aureus* isoladas em diferentes regiões do estado de Jalisco

No dendrograma dos pulsotipos dos isolados da região de Altos Norte, observou-se 84,9% de similaridade genética, o que corresponde a 15,1% da variação genética dos 14 isolados dos municípios de Encarnación de Díaz, Lagos de Moreno e San Juan de los Lagos (Figura 3).

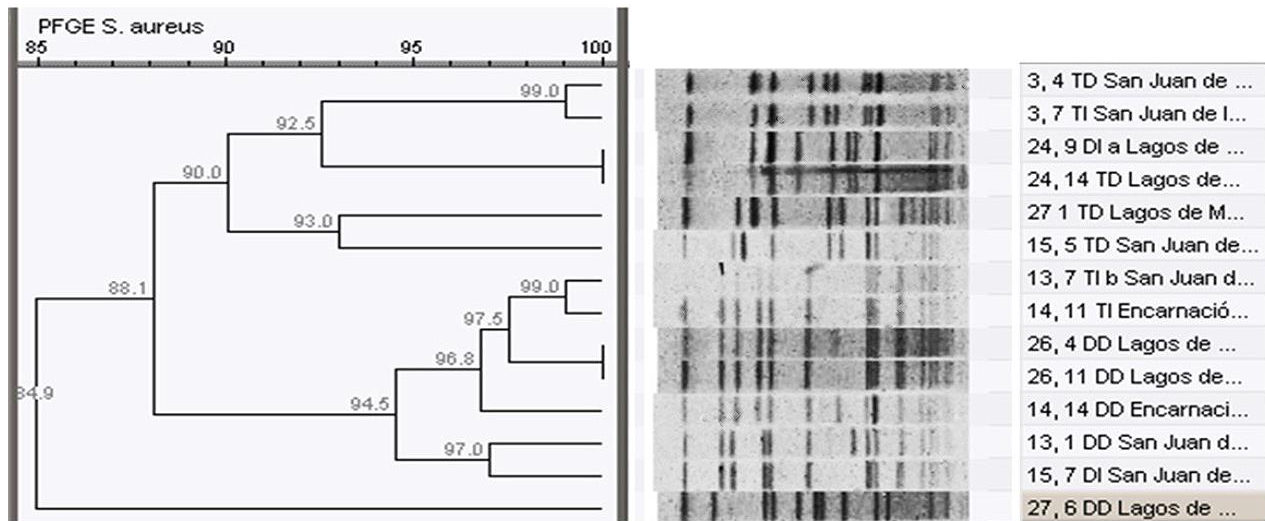


Figura 3. Dendrograma dos pulsotipos de 14 cepas de *S. aureus* isoladas na região dos Altos Norte do estado de Jalisco

No dendrograma dos pulsotipos das cepas isoladas da região de Altos Sur foi observada uma similaridade genética de 89,8%, o que corresponde a 10,2% de variação genética das 8 cepas isoladas dos municípios de Acatic, Arandas, San Miguel el alto e Tepatitlán de Morelos (Figura 4).

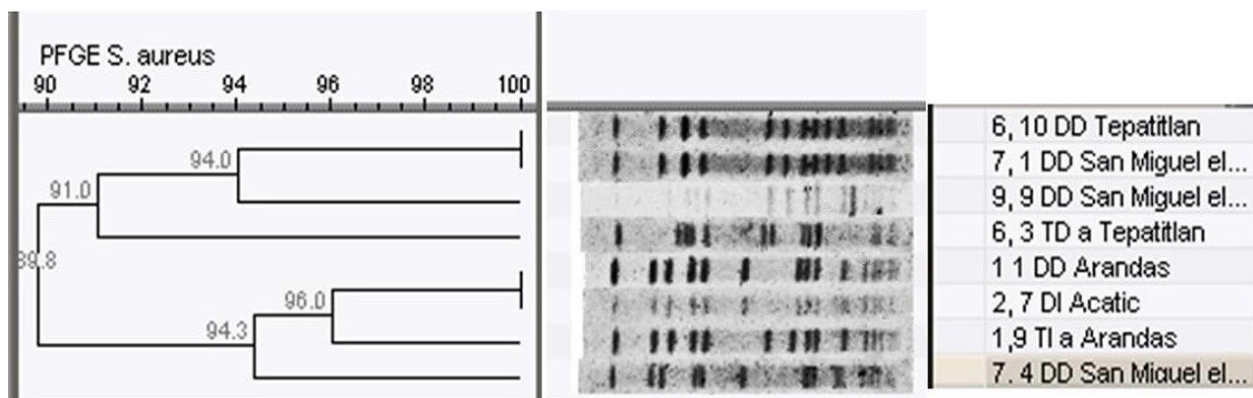


Figura 4. Dendrograma dos pulsotipos de 8 cepas de *S. aureus* isoladas na região de Altos Sur do estado de Jalisco

No dendrograma dos pulsotipos dos isolados da região de Ciénega, observou-se um percentual de 90,2% de similaridade genética, o que corresponde a 9,8% da variação genética dos 10 isolados dos municípios de Atotonilco el Alto, Barca e Tototlán (Figura 5).

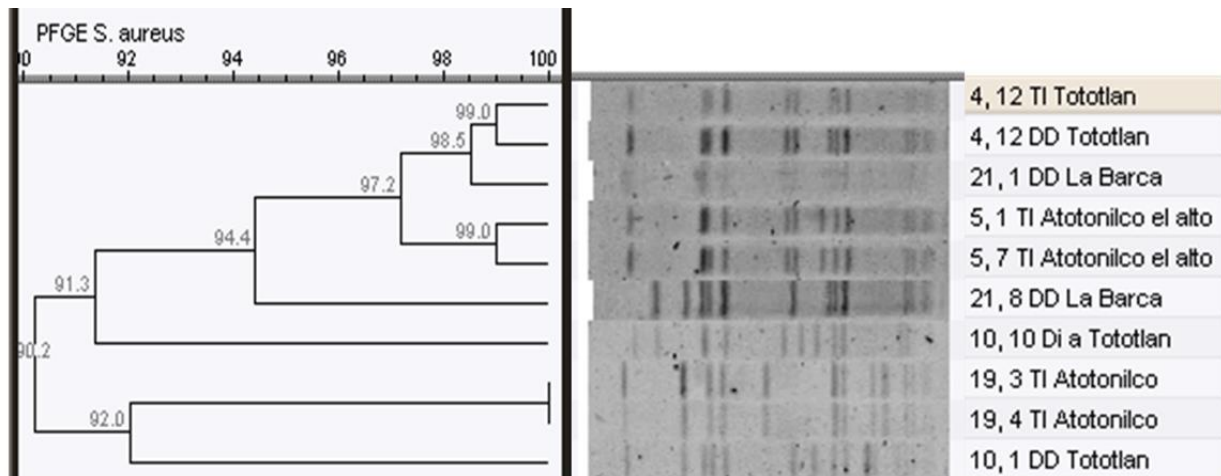


Figura 5. Dendrograma dos pulsotipos de 10 cepas de *S. aureus* isoladas na região de Ciénega do estado de Jalisco

Dentro da relação das características morfológicas das cepas estudadas com seu perfil genético (pulsotipo) na técnica de variação genética, observou-se que as cepas de *S. aureus* idênticas na técnica PFGE (100% de similaridade) apresentaram características morfológicas idênticas. Enquanto a cepa (38,27, 6 DD) se destacou de todas as demais em sua cultura, pois apresentou beta hemólise pronunciada de 15 mm; da mesma forma, foi a cepa que apresentou o pulsotipo com maior variação genética na técnica PFGE.

DISCUSSÃO

Pelos achados encontrados, estabelece-se que existem variações genéticas superiores a 10% dos *Staphylococcus aureus* isolados de vacas leiteiras no estado de Jalisco, sendo encontrada uma variação genética de 14,9% entre as 32 cepas analisadas neste estudo. Os resultados relacionados à variação genética observada no presente trabalho são semelhantes aos citados por [Can et al., \(2017\)](#), que encontraram uma relação genética de 90% de cepas isoladas de leite de vaca cru na Turquia, o que corresponde a 10 % variação genética. No mesmo estudo, as cepas de *S. aureus* obtidas de amostras de leite de vaca cru, carne, queijo e frango na Turquia foram analisadas juntas; onde a variação genética aumentou até 25%, o que significa que existem tipos geneticamente semelhantes de perfis genéticos em amostras de leite; talvez porque os *S. aureus* isolados do leite apresentem um genótipo relativamente semelhante, pois requerem as mesmas características que permitem sua adaptação, tanto dentro quanto fora da glândula mamária.

Os resultados apresentados neste estudo são semelhantes aos resultados de [Castañeda et al., \(2011\)](#), que concluíram que existe uma estreita relação genética de *S. aureus*, responsável pela mastite; sugerindo que clones intimamente relacionados de *S. aureus* são responsáveis pela maioria das infecções intramamárias causadas no estado de

Jalisco. No entanto, diferem dos resultados gerados com os obtidos por [Sato et al., \(2017\)](#), que encontraram variações genéticas de até 30% em 41 cepas de *S. aureus* isoladas no Japão; talvez porque cepas isoladas de humanos e carne destinada à venda também sejam levadas. Portanto, o alto percentual de variação apresentado parece compreensível, uma vez que as linhagens tendem a desenvolver características elementares que as permitem se adaptar às condições do local de onde estão isoladas.

Embora uma alta porcentagem (42,71%) tenha sido obtida na frequência de mastite nas vacas amostradas, apenas cerca de 20% das glândulas mamárias amostradas representavam mastite clínica e graus 2 e 3 de mastite subclínica; portanto, cerca de 80% das glândulas foram identificadas como negativas para mastite e mastite subclínica grau 1. Por outro lado, em estudo realizado por [Manjarrez et al., 2012](#), foi encontrada maior frequência de mastite no estado do México ; que citam 6,1% de mastite clínica e 48,3% de mastite subclínica, sendo isso compreensível uma vez que foram amostrados apenas pequenos estábulos do tipo familiar, os quais apresentaram baixo nível de tecnificação; Isso representa deficiência na técnica de ordenha e pouco controle da mastite, diferindo da amostra do nosso estudo em que, além das cocheiras familiares, foram escolhidas cocheiras semitécnicas e técnicas; portanto, a frequência de mastite obtida em nosso estudo foi menor.

Por outro lado, [Yera y Ramírez, 2016](#), registraram uma frequência de aparecimento de *S. aureus* de 8,75% em vacas mestiças Holstein x Cebu, frequência inferior à obtida que foi de 9,8%; talvez devido a uma melhor resistência à infecção nos animais amostrados por serem animais híbridos. [Boscán et al., \(2009\)](#), observaram uma frequência de aparecimento de *S. aureus* de 12,15%, superior à apresentada neste estudo, também diferindo da metodologia de amostragem, uma vez que as amostras de leite foram colhidas apenas em vacas com diagnóstico de mastite subclínica e que estavam no início do período seco. [Castañeda et al., \(2013\)](#), no estado de Jalisco, apresentou uma frequência de *S. aureus* ao nível de celeiro de 100%, sendo a frequência superior à apresentada, que foi de 66,7%; provavelmente pelo fato de neste estudo ter sido semeado apenas leite pertencente a glândulas com diagnóstico de mastite; ao contrário do nosso estudo, em que todas as amostras de leite foram semeadas independentemente de seu resultado no diagnóstico de mastite.

CONCLUSÕES

O grupo de pulsotipos de *S. aureus* P3 representou 25% do perfil genético total (pulsotipos) das cepas isoladas (8/32), estando presente em todas as regiões amostradas de Jalisco. A variação genética em comparação com a variação morfológica foi idêntica. Da mesma forma, as cepas isoladas dentro de um mesmo estábulo apresentaram notável similaridade genética, chegando a 100% de similaridade em vários estábulos. Os resultados do presente estudo fornecem informações valiosas que podem ser

complementares na área da epidemiologia molecular necessária ao controle, tratamento e produção das vacinas necessárias para a mastite por *S. aureus*.

LITERATURA CITADA

BABA T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki KC, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community acquired MRSA. *Lancet*. 359: 1819-1827. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08713-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08713-5)

BARNUM DA, Newbould FHS. 1961. The use of the California mastitis test for the detection of bovine mastitis. *The Canadian Veterinary Journal*, 2(3), 83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1585631/>

BEDOLLA CC, Ponce de León MER. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Rev Electrón Vet*. 9: 1-26. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63611952010>

BEDOLLA CC, Castañeda VH, Wolter W. 2007. Métodos de detección de mastitis bovina. *Rev Electrón Vet*. 8: 1-17. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012036579>

BOSCÁN J, Villaroel R, Oviedo A, Sánchez A, Pino D, García D, Hernández L, Pérez M. 2009. Bacterias patógenas potenciales al inicio del período seco de vacas doble propósito con mastitis subclínicas. *Revista Científica de Maracaibo*. 19: 277- 283. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95911669010>

CALDERÓN A, Rodríguez V. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 21: 582-589. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2897973>

CAN HY, Elmalı M, Karagöz A. 2017. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean J Food Sci An*. 37: 175. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.175>

CASTAÑEDA VH, Jäger S, Wolter W, Zschöck M, Castañeda VMA, El-Sayed A. 2011. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in México. *Rev Científ*. 21: 308-316. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918727005>

CASTAÑEDA VH, Jäger S, Wolter W, Zschöck M, Castañeda VMAC, El-Sayed A. 2013. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 65:377-382. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200012>

CASTAÑEDA VH, Wolter W, Serratos JM, Castañeda VM, Salas CEP, Alvarez-Moya C. 2018. Avances en las investigaciones de *Staphylococcus aureus* como agente patógeno causante de mastitis bovina, mediante biología molecular. En: Bienestar animal en la práctica, en producciones lecheras, desde la perspectiva europea. Edited and published by Frank JCM, Van Eerdenburg. Pp. 108-121.

<https://www.dropbox.com/s/q9jdztauo43io26/Bienestar%20animal%20en%20la%20practica.pdf?dl=0>

CERVANTES-GARCÍA E, García-González R, Salazar-Schettino PM. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 61: 28-40. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>

CHAPAVAL L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. 2008. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*: 60(2):299-306. https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352008000200004&script=sci_arttext

ECHEVERRI JJ, Jeramillo MG, Restrepo LF. 2010. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del departamento de antioquia. *Rev. Lasallista investig.* 7: 49-57. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69514965007>

EL-SAYED A, Alber J, Lämmle C, Abdulmawjood A, Zschöck M, Castaneda VH. 2006a. Comparative sequence analysis of spa gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: characterization of an unusual spa gene variant. *J dairy Res*. 73: 322-327. <https://doi.org/10.1017/S002202990600183X>

EL-SAYED A, Alber J, Lämmle C, Jäger S, Wolter W, Castañeda-Vázquez H. 2006b. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet Mex*. 37: 165-179. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDREVISTA=39&IDARTICULO=8854&IDPUBLICACION=976>

EL-SAYED A, Walid Awad, Nadra-Elwgoud Abdou, Hugo Castañeda Vázquez. 2017. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens, *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 5(2):89-97. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.ijvsm.2017.08.002>

GAMBOA ME. 2017. Estadística aplicada a la investigación científica. En J.C. Arboleda (Ed.). Apropiación, generación y uso solidario del conocimiento (pp. 59-76). Las Tunas, Cuba: Editorial Redipe-Edacun. ISBN 9781945570148 <http://roa.ult.edu.cu/handle/123456789/3667>

GARCÍA GM, Montoya GN, López VM, Aguilar MSW, Salvador Lagunas BS, Valladares CB, Vázquez ChJC, Castañeda H, Velázquez OV. 2019. Caracterización de los ecotipos de *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros de producción familiar en el Valle de Toluca, México. Pp. 455-492. En: Temas selectos en la Innovación de las Ciencias Agropecuarias, Ciudad de México: Alfaomega Grupo Editor: Ciudad de México: Universidad del Estado de México. 2019. ISBN 9786075384115

KURODA Makoto Toshiko Ohta, Ikuo Uchiyama, Tadashi Baba, Harumi Yuzawa, Ichizo Kobayashi, Longzhu Cui, Akio Oguchi, Ken-ichi Aoki, Yoshimi Nagai, JianQi Lian, Teruyo Ito, Mutsumi Kanamori, Hiroyuki Matsumaru, Atsushi Maruyama, Hiroyuki Murakami, Akira Hosoyama, Yoko Mizutani-Ui, Noriko K Takahashi, Toshihiko Sawano, Ryu-ichi Inoue, Chikara Kaito, Kazuhisa Sekimizu, Hideki Hirakawa, Satoru Kuhara, Susumu Goto, Junko Yabuzaki, Minoru Kanehisa, Atsushi Yamashita, Kenshiro Oshima, Keiko Furuya, Chie Yoshino, Tadayoshi Shiba, Masahira Hattori, Naotake Ogasawara, Hideo Hayashi, Keiichi Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357:1225-1240. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04403-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04403-2)

MANJARREZ LAM, Díaz ZS, Salazar GF, Valladares CB, Gutiérrez CADC, Barbabosa PA, Talavera RM, Alonso FMU, Velázquez OV. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Rev Mex Cienc Pecu*. 3:265-274. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000200008

MARQUÉS VF, De Souza MMS, Mendonça ECL, Alencar TA, Pribul BR, Coelho SMO, Lasagno M, Reinoso EB. 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras*. 33:161-170. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2013000200005&script=sci_arttext

MENZIES, R. E. 1977. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical pathology*, 30(7), 606-608. <https://jcp.bmj.com/content/30/7/606.abstract>

SATO T, Usui M, Konishi N, Kai A, Matsui H, Hanaki H, Tamura Y. 2017. Closely related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat, cows with mastitis, and humans in Japan. *PloS one*. 12: e0187319. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187319>

SCHUKKEN YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine CM, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth JH, Sipka A, Smith EDG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunop.* 144: 270-289. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>

SCHALM OW, Noorlander DO. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *JAVMA.* 130:199-204.

SHARMA-KUINKEL BK, Rude TH, Fowler VG. 2016. Pulse-field gel electrophoresis. En Bose JL. *The Genetic Manipulation of Staphylococci: Methods and Protocols.* Pp. 117-130. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-3158-3>

SPERBER, W. Z., y Tatini, S. R. 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol.* 29: 502-505. <https://aem.asm.org/content/29/4/502.short>

STRUELENS MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E. 2009. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol infect.* 15: 112-119. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02698.x>

VAN SFJ, Santman-Berends IM, Lam TJ, Hogeveen H. 2016. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *J Dairy Sci.* 99:8365-8374. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10561>

VASCONCELOS NG, Ribeiro de Souza da Cunha MI. 2010. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology.* 2(3):29-42. ISSN 2141-2316. <http://www.academicjournals.org/jphe>

WOLTER W, Castañeda H, Kloppert B, Zschock M. 2004. Mastitis Bovina. Ed., Editorial Universitaria. Pp. 18-48. ISBN. 3-7862-0099-8.

YERA PG, Ramírez W. 2016. La Prevalencia de mastitis clínica en vacas mestizas Holstein x Cebú. *REDVET.* 17:1-7. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63646040004> - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030316.html>

ZSCHÖCK M, Sommerhaeuser J, Castaneda VH. 2000. Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd. *J Dairy Res.* 67: 429-435. <https://doi.org/10.1017/S0022029900004325>