

## Detección de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México<sup>#</sup>

Detection of *mecA*, *mecI* and *mecRI* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of bovine origin isolated from Family Dairy Farms, Mexico

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

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

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

### SUMMARY

In Mexico, as in other countries, *Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens causing bovine Mastitis. This disease is usually treated with  $\beta$ -lactam antibiotics; however, in Mexico there are some reports of resistant *Staphylococcus aureus* to these antibiotics. The molecular mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* have not been widely studied yet. In this study, we identified *Staphylococcus aureus* isolated from bovines by detecting the *femB* gene, while resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics was determined by *in vitro* antimicrobial susceptibility, and the genes *blaZ*, *mecA*, as well as regulator genes *mecRI* and *mecI*, were identified by PCR. The results showed *Staphylococcus aureus* presenting higher resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics and to erythromycin. The *blaZ* gene was identified in only 38 isolates (44.7%). Four *Staphylococcus aureus* isolates carried the *mecA* gene and were considered as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; they were grouped as follows according to their regulator genes: one carried both *mecI* and *mecRI* genes (group A); in two of them neither the *mecI* gene nor the *mecRI* gene (PB domain) were found (group C); and one isolate did not carry any regulator gene (group D). In conclusion, we identified the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics in family dairy production in the State of Mexico. This resistance might be regulated by different genotypes of the *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

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

### RESUMEN

En México como en otros países, *Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos causantes de mastitis bovina. El tratamiento de esta enfermedad se realiza principalmente con antibióticos  $\beta$ -lactámicos; sin embargo, en México existen estudios de *Staphylococcus aureus* resistente a este tipo de antibióticos, actualmente los mecanismos moleculares de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina no han sido ampliamente estudiados. En este trabajo se identificó *Staphylococcus aureus* aislados de bovinos mediante la detección del gen *femB*, utilizando ambos métodos, microbiológicos convencionales y moleculares. La resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue determinada por pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* y por PCR de los genes *blaZ*, *mecA* y los genes reguladores *mecRI* y *mecI*. Los resultados mostraron una mayor resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a la eritromicina, solamente 38 (44,7%) de los aislamientos fueron positivos al gen *blaZ*. Por otro lado, cuatro *Staphylococcus aureus* fueron positivos al gen *mecA* considerados como SARM, los que por la detección de sus genes reguladores se agruparon de la siguiente forma: uno fue positivo a los genes *mecI* y *mecRI* (grupo A), dos no presentaron el gen *mecI* ni el dominio PB del gen *mecRI* (grupo C) y uno no mostró ningún gen regulador (grupo D). En conclusión, se identificó la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en unidades de producción lechera familiar en el estado de México, y su resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Esta resistencia podría estar regulada por diferentes genotipos de los genes *mecA*, *mecRI* y *mecI* presentes en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

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

Aceptado: 16.10.2014.

<sup>#</sup> Financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), bajo el proyecto de investigación clave 3484/2013CHT y SEP-PROMEP, fortalecimiento de cuerpos académicos 2010.

<sup>\*</sup> Km 15,5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Toluca, estado de México, México C.P. 50200; vvo@uaemex.mx

## INTRODUCCIÓN

En México la producción lechera familiar es un sistema predominante, caracterizada por la explotación del ganado en pequeñas superficies, manejo tradicional no tecnificado con ordeño manual; instalaciones rústicas y escasas medidas de higiene<sup>1</sup> (Méndez y Cazarín y col 2000); estas condiciones de las unidades de producción y la mala higiene durante el ordeño contribuyen al desarrollo de infecciones intramamarias; principalmente producidas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Ávila y Gutiérrez 2002). Este agente patógeno es considerado como el principal causante de la mastitis bovina en las unidades lecheras familiares en diferentes regiones de México (Manjarrez y col 2012, Castañeda y col 2013). Uno de los principales problemas para el control de la mastitis producida por *S. aureus* se relaciona con diferentes niveles de resistencia a los antibióticos, particularmente a los  $\beta$ -lactámicos. Existen diferentes mecanismos por los que *S. aureus* ha adquirido resistencia a este grupo de antibióticos; uno es la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasa, otro es la modificación de las proteínas de unión a las penicilinas y resistencia intrínseca a meticilina, la que ha sido ampliamente estudiada, esta característica de resistencia se observa en *S. aureus* que incorporaron a su genoma el gen *mecA*. Una situación que actualmente constituye una alerta epidemiológica a nivel mundial, debido a la emergencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (Daka y col 2012, Kumar y col 2011). De esta forma los SARM producen una proteína de unión a la penicilina denominada PBP2a, codificada por el gen *mecA*; esta proteína mantiene la integridad de la pared celular durante el crecimiento y la división de las bacterias cuando las enzimas habituales son inhibidas por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La transcripción del gen *mecA* es regulada por los genes *mecR1* que codifica la proteína de transducción de señal (MecR1), y *mecI* que codifica la proteína represora de transcripción (MecI) (Hiramatsu y col 2002). Además, los genes *blaR1* y *blaI* reguladores del gen *blaZ* que codifica para la resistencia a la penicilina participan en la corregulación de la transcripción del gen *mecA* (Lewis y Dyke 2000). La transcripción del gen *mecA* se produce cuando la proteína MecR1 se expone a los  $\beta$ -lactámicos con su dominio extracelular de unión a penicilina (PB), activando su dominio citoplásmico (MS) en forma de proteasa; a continuación se escinde la proteína represora MECI, la que bloquea la región operadora del gen *mecA* expresando la PBP2a (Zhang y col 2001). Los genes *mecR1* y *mecI* han sido identificados en *S. aureus* de origen humano (Weller 1999, Petinaki y col 2001) y bovino (Lee 2006). En México se ha identificado SARM en bovinos con mastitis, pero la identificación del gen

*mecA* y sus elementos regulatorios *mecR1* y *mecI* aún no han sido estudiados. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de SARM que poseen el gen *mecA* en bovinos de unidades de producción lechera familiar, ubicadas en el estado de México.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo estratificado en los municipios de Temoaya, Tenango del Valle, Toluca y Zinacantepec, estado de México. El tamaño de la muestra se calculó basándose en la población de vacas lecheras<sup>2</sup>; una prevalencia del 23% de *S. aureus* (Manjarrez y col 2012), un intervalo de confianza del 95% y error estimado del 5% (Thrusfield, 1990). El muestreo se realizó en 27 explotaciones lecheras caracterizadas por un tamaño de 6-25 vacas, manejo tradicional y ordeño manual. Se recolectaron 302 muestras de leche, las que se obtuvieron de los cuatro cuartos glandulares de manera aséptica (NMC 1999), procedente de vacas en diferentes etapas de lactación y número de parto, sin signos de mastitis.

Para el aislamiento de *S. aureus* las muestras se inocularon en placas de agar sangre (BD Bioxon, México) y agar sal manitol (BD Bioxon, México), a 37 °C por 24 horas. La identificación fenotípica se basó en las características morfológicas de las colonias (Bautista-Trujillo y col 2013) y en los resultados de las pruebas de coagulasa, catalasa y tinción de Gram. La confirmación de *S. aureus* se llevó a cabo por PCR mediante la detección del gen *femB* (cuadro 1). Como cepas controles se utilizaron: *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228. La sensibilidad *in vitro* se realizó por el método de difusión en disco, empleando los siguientes antibióticos (Bio-Rad, México): Penicilina, Ampicilina, Oxacilina, Cefoxitina, Amoxicilina/Ácido clavulánico, Gentamicina, Tetraciclina, Eritromicina, Trimetoprim-sulfametoxazol, Cefalotina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftazidima. Los aislamientos resistentes a oxacilina se sometieron a la prueba de oxacillin agar screen (CLSI 2012).

Se determinaron los genes *blaZ* (Schnellmann y col 2006) y *mecA* (Kobayashi y col 1994) (cuadro 1). Las cepas positivas al gen *mecA* se sometieron a una PCR para detectar los genes *mecR1* y *mecI*. Se utilizaron los partidores *mecR1A* para el dominio citoplásmico (MS) y *mecR1B* para el dominio de unión a la penicilina (PB) del gen *mecR1* (Kobayashi y col 1996). La mezcla de reacción de la PCR consistió en 100 ng de ADN, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 10  $\mu$ M de los partidores excepto para los partidores *femB* 13  $\mu$ M, 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y Buffer 10X, las condiciones de amplificación están indicadas en el cuadro 1. Se utilizó

<sup>1</sup> Méndez y Cazarín MD, RT Rascón, DV Arreola. 2000. Evaluación productiva, de efecto ambiental y de problemas relevantes en explotaciones lecheras de pequeña escala. *Livest Res Rural Dev* 12: <http://www.cipav.org.co/lrrd/12/1/manu121.htm>.

<sup>2</sup> INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Estados Unidos Mexicanos. 2007. Censo Agropecuario. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>. (Agosto 2011)

**Cuadro 1.** Secuencias de los partidores utilizados en la PCR y condiciones de amplificación.  
Sequences of the primers used for PCR and amplification conditions.

Gen	Secuencia de nucleótidos (5' → 3')	Tamaño am- plicón (pb)	Condiciones de amplificación	Referencia
<i>mecA</i>	Sentido: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC Antisentido: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	Desnaturalización inicial: 94 °C por 5 min; desnaturalización 94 °C por 1 min; alineación: 55 °C por 1 min; extensión: 72 °C por 2 min 30 ciclos, y extensión final a 72 °C por 7 min.	Kobayashi y col (1994)
<i>femB</i>	Sentido: TTACAGAGTTAACTGTTACC Antisentido: ATACAAATCCAGCACGCTCT	651		
<i>mecRI</i> (dominio MS)	Sentido: GTCTCCACGTTAATTCCATT Antisentido: GTCGTTTCATTAAGATATGACG	310	Desnaturalización inicial: 94 °C por 5 min; desnaturalización 97 °C por 1 min; alineación: 57 °C por 1 min; extensión: 72 °C por 2 min 30 ciclos, y extensión final a 72 °C por 7 min.	Kobayashi y col (1996)
<i>mecRIB</i> (dominio PB)	Sentido: AAGCACCGTTACTATCTGCACA Antisentido: GAGTAAATTTGGTTCGAATGCC	236		
<i>mecI</i>	Sentido: AATGGCGAAAAAGCACACA Antisentido: GACTTGATTGTTTCTCTGTT	481		
<i>blaZ</i>	Sentido: CAGTTCACATGCCAAAGAG Antisentido: TACTCTTGGCGGTTTC	772	Desnaturalización inicial: 94 °C por 3 min; desnaturalización 94 °C por 1 min; alineación: 50 °C por 1 min; extensión: 72 °C por 1 min 30 ciclos, y extensión final a 72 °C por 5 min.	Schnellmann y col (2006)

la cepa control *S. aureus* ATCC 43300. La clasificación de los genes reguladores se realizó de acuerdo con Suzuki y col (1993), donde los SARM fueron agrupados con relación a la detección de los genes: grupo A, aquellos que contenían los genes reguladores; grupo B, los que no portaron el gen *mecI*; grupo C, donde el gen *mecI* y el dominio PB del gen *mecRI* estaban suprimidos y grupo D, aquellos que carecieron de los genes reguladores. Los resultados fueron evaluados mediante la prueba de T con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 302 muestras de leche obtenidas solo en 85 (28,1%) se obtuvo aislamientos de *S. aureus*; mediante pruebas bacteriológicas todos los aislados fueron positivos al gen *femB*. La frecuencia de *S. aureus* obtenida en este estudio fue concordante con la frecuencia de aislamientos de *S. aureus* en condiciones semejantes en otras regiones de México (Manjarrez y col 2012, Ochoa-Zarzosa y col 2008). Para identificar SARM utilizamos la prueba de sensibilidad *in vitro* y la prueba de oxacillin agar screen; los perfiles obtenidos en la primera prueba se muestran en el cuadro 2; brevemente, en relación con la resistencia para antibióticos  $\beta$ -lactámicos 38 (44,7%) fueron resistentes a penicilina, de estos 17 (20%) también fueron resistentes a oxacilina y solo 4 (4,7%) fueron también resistentes a cefoxitina, por tanto estos cuatro aislados fueron seleccionados como candidatos a ser SARM; mientras que en la

prueba de oxacillin agar screen se obtuvieron 13 aislados positivos, los que podrían ser candidatos a SARM. Los 13 aislados fueron analizados por PCR para la identificación del gen *mecA*, los resultados de la PCR indicaron que la prueba de sensibilidad *in vitro* fue más eficiente para identificar aislados SARM porque los cuatro aislados candidatos seleccionados por esta prueba fueron los únicos que presentaron amplificación del gen *mecA*.

La resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos por *S. aureus* fue concordante con lo informado por Ochoa-Zarzosa y col (2008) y Daka y col (2012); sin embargo, los perfiles de estos antibióticos fueron diferentes en los tres estudios, mientras que Ochoa-Zarzosa y col (2008) observaron que todos sus aislados de *S. aureus* fueron resistentes a ampicilina, ceftazidima y penicilina. Daka y col (2012) observaron una mayor resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, eritromicina y vancomicina.

En algunos estudios se ha informado que aislados de *S. aureus* sensibles a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos portan el gen *mecA*; por lo tanto, para determinar si aislados de *S. aureus* sensibles a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y los resistentes a los mismos portaban el gen *mecA*, la prueba de PCR se realizó en los 85 aislados de este estudio, y los resultados indicaron que solo aquellos aislados resistentes fueron positivos a este gen. Solo en tres de los cuatro SARM identificados el gen *mecRI* fue positivo, y de estos solo en uno amplificaron las dos regiones y solo en dos amplificó únicamente la región citoplasmática. Las PCR fueron valoradas utilizando como control la cepa

**Cuadro 2.** Sensibilidad *in vitro* a los antibióticos de *Staphylococcus aureus*.  
*In vitro* sensitivity to antibiotics of *Staphylococcus aureus*.

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

Las literales desiguales tienen diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ).  
 Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos están marcados en negritas.

**Cuadro 3.** Identificación de los genes reguladores en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.  
 Identification of regulatory genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.

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

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

ATCC 43300 en la cual amplificaron ambas regiones. En el caso del gen *mecI* este solo fue identificado en una cepa (cuadro 3). Estos resultados coinciden con estudios anteriores, donde se identificó al gen *mecI* en menor proporción (Weller y col 1999, Lee 2006). Felten y col (2002) observaron que el 92,8% de los aislados de *S. aureus* que portaban el gen *mecR1* podría estar truncado, y no portar el gen *mecI*; lo que podría permitir la expresión del gen *mecA* independiente de *mecR1*

En este estudio, también se identificó un SARM negativo a los genes *mecR1* y *mecI*, este hallazgo ha sido descrito por Petinaki y col (2001) y Felten y col (2002). Este hallazgo indica que el gen *mecA* puede expresarse en forma constitutiva en ausencia de los genes reguladores.

De esta forma la clasificación de los aislados SARM que identificamos se estableció como sigue: una cepa (25%) se clasificó en el grupo A, dos cepas (50%) al grupo C y una (25%) al grupo D (cuadro 3). Estos resultados son diferentes a los informados por Kobayashi y col (1996),

donde el 94,3% de los SARM correspondieron al grupo A, el 2,5% al grupo B y D y 0,8% al grupo C.

Futuros estudios sobre SARM de origen animal son necesarios para dilucidar su diversidad genética en nuestro país. En conclusión, los SARM identificados en las unidades de producción lechera familiar en el estado de México muestran diferentes genotipos en cuanto a la distribución de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI*; además este es el primer estudio que reporta la existencia de la expresión inducida y constitutiva de la PBP2a debido a diferentes genotipos en los genes reguladores del gen *mecA* en SARM en vacas lecheras en México.

#### AGRADECIMIENTOS

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

## REFERENCIAS

- Ávila TS, CA Gutiérrez. 2002. Comparación del estado de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. *Vet Méx* 33, 387-394.
- Bautista-Trujillo GU, JL Solorio-Rivera, I Rentería-Solórzano, SI Carranza-Germán, JA Bustos-Martínez, RI Arteaga-Garibay, VM Baizabal-Aguirre, M Cajero-Juárez, A Bravo-Patiño, JJ Valdéz-Alarcón. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol* 62, 369-376.
- Castañeda VH, S Jäger, W Wolter, M Zschöck, MA Castañeda Vazquez, A El-Sayed. 2013. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arq Bras Med Vet Zootec* 65, 377-382.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second Informational Supplement M100-S22*. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Daka D, S G/silassie, D Yihdego. 2012. Antibiotic-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk in the Hawassa area, South Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 11, 26.
- Felten A, B Grandry, PH Lagrange, I Casin. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 System, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 40, 2766-2771.
- Hiramatsu K, Y Katayama, H Yuzawa, T Ito. 2002. Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 292, 67-74.
- Kobayashi N, H Wu, K Kojima, K Taniguchp, S Urasawa, N Uehara, Y Omizu, Y Kishi, A Yagihashi, I Kurokawa. 1994. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of Staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 113, 259-266.
- Kobayashi N, K Taniguchi, K Kojima, S Urasawa, N Uehara, Y Omizu, Y Kishi, A Yagihashi, I Kurokawa, N Watanabe. 1996. Genomic diversity of *mec* regulator genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Epidemiol Infect* 117, 289-295.
- Kumar R, BR Yadav, RS Singh. 2011. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *J Biosci* 36, 175-188.
- Lee JH. 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes. *Vet Microbiol* 114, 155-159.
- Lewis RA, KG Dyke. 2000. *mecI* represses synthesis from the beta-lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 45, 139-144.
- Manjarrez LAM, ZS Díaz, GF Salazar, CB Valladares, CAC Gutiérrez, PA Barbabosa, RM Talavera, FMU Alonso, OV Velázquez. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. *Rev Mex Cienc Pecu* 3, 265-274.
- NMC, National Mastitis Council. 1999. *Laboratory handbook on bovine mastitis*. National Mastitis Council Inc 2820 Madison, USA.
- Ochoa-Zarzosa A, PD Loeza-Lara, F Torres-Rodríguez, H Loeza-Ángeles, N Mascot-Chiquito, S Sánchez-Baca, JE López-Meza. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 199-206.
- Petinaki E, A Arvaniti, G Dimitracopoulos, I Spiliopoulou. 2001. Detection of *mecA*, *mecRI* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. *J Antimicrob Chemother* 47, 297-304.
- Schnellmann C, V Gerber, A Rossano, V Jaquier, Y Panchaud, MG Doherr, A Thomann, R Straub, V Perreten. 2006. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J Clin Microbiol* 44, 4444-4454.
- Suzuki E, K Kuwahara-Arai, JF Richardson, K Hiramatsul. 1993. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1219-1226.
- Thrusfield M. 1990. *Epidemiologia Veterinaria*. Editorial Acribia. Zaragoza, España, Pp 194-195.
- Weller TMA. 1999. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J Antimicrob Chemother* 43, 15-22.
- Zhang HZ, CJ Hackbarth, KM Chansky, HF Chambers. 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* 291, 1962-1965.