

Resistencia a penicilina G y oxacilina, de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina subclínica

Penicillin G and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis

Michael Zschöck* Amr El-Sayed** Nawara Eissa*
Christoph Lämmler*** Hugo Castañeda-Vazquez†

Abstract

Sixty-eight out of 530 different *S. aureus* field strains isolated from subclinical cases of bovine mastitis from Germany (n = 26), Indonesia (n = 16), Mexico (n = 16) and Brazil (n = 10), respectively, were selected to be studied in the present work. The strains were tested phenotypically as well as genotypically for the presence of penicillin G- and oxacillin-resistance. For the primary phenotypical species identification of the 530 *S. aureus* strains, plasmacoagulase-test and Api 32 Staph system was applied. This was confirmed by molecular detection of the *S. aureus* specific genes encoding 23 S rRNA, thermostable nuclease (*nuc*), clumping factor (*clfA*), coagulase (*coa*) and protein A region Xr (*spa*). The selection of the 68 strains was carried out by the random selection of one strain per herd; additionally, only strains with different macrorestriction profiles were included here. Genotypic resistance to semisynthetic penicillins (methicillin/oxacillin) and penicillin G was studied through the identification of *mecA*- and *blaZ*-genes, respectively. The *mecA* gene was detected in only one *S. aureus* isolate from Brazil, which was not phenotypically resistant against methicillin, as shown by the use of standard disc diffusion method, BBL-Chromoagar and MIC-determination by Vitek II. In contrast penicillin-resistance of strains based on the presence of the *blaZ*-gene could be observed in 50 (73.5%) of the investigated strains. However, only 40 (58.8%) of these 50 *blaZ*-positive strains were phenotypically penicillin-resistant. According to the presented data, resistance to semisynthetic penicillins in *S. aureus* field strains seems to be not a major problem in dairy herds of the investigated countries despite the long-term use of these antibiotics in the field.

Key words: *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, BOVINE MASTITIS, GERMANY, INDONESIA, MEXICO, BRAZIL, OXACILLIN, PENICILLIN G, RESISTANCE.

Resumen

De 530 diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis subclínica bovina, se seleccionaron 68 cepas de *S. aureus* procedentes de Alemania (n = 26), Indonesia (n = 16), México (n = 16) y Brasil (n = 10), para estudiarlas en la presente investigación. Las cepas fueron analizadas fenotípica y genotípicamente para observar su resistencia a penicilina G y oxacilina. Para una identificación inicial se utilizó el sistema Api 32 Staph y la prueba de coagulasa. El resultado se confirmó por la detección molecular de los genes específicos de *S. aureus* 23S rRNA, nucleasa termoestable (*nuc*), factor aglutinante (*clfA*), coagulasa (*coa*) y la proteína A (*spa*) región Xr. La selección primaria de las cepas sospechosas se hizo al azar, seleccionando una cepa por hato; además sólo se incluyeron en el estudio cepas con diferentes perfiles de macrorestricción. La resistencia genotípica a meticilina y penicilina se estudió mediante la identificación de los genes *mecA* y *blaZ*, respectivamente. El gen *mecA* fue detectado sólo en un aislamiento de *S. aureus* de Brasil y no fue resistente fenotípicamente a la meticilina, lo cual se demostró mediante los métodos de difusión estándar en discos, el uso del Chromoagar-BBL y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) por Vitek II. La detección genotípica de la resistencia de las cepas a la penicilina se basó en la detección del gen *blaZ*; y se observó en 50 cepas investigadas (73.5%). Sin embargo, sólo 40 cepas (58.8%) fueron fenotípicamente resistentes a la penicilina. Los resultados obtenidos muestran que la resistencia de las cepas aisladas de campo *S. aureus* a las penicilinas semisintéticas, actualmente no es un problema importante en las vacas lecheras, a pesar del uso extensivo de esas sustancias antibióticas en el campo en los países investigados.

Palabras clave: *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, MASTITIS BOVINA, ALEMANIA, INDONESIA, MÉXICO, BRASIL, OXACILINA, PENICILINA G, RESISTENCIA.

Recibido el 6 de mayo de 2010 y aceptado el 14 de marzo de 2011.

*Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Abteilung II (Veterinärmedizin), Schubertstr. 60, 35392 Giessen, Alemania.

**Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Giza Square, Cairo University, Egipto.

***Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-University, Frankfurter Str. 107, 35392 Giessen, Alemania.

†Laboratorio de Mastitis y Diagnóstico Molecular, Departamento de Medicina Veterinaria, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, km 15.5 de la Carretera Guadalajara-Nogales, Zapopan, Jalisco, México.

Contacto: Dr. Michael Zschöck, Correo electrónico: michael.zschoeck@lhl.hessen.de

Introduction

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens responsible for a large variety of serious diseases in human and animals. Mastitis is one of the main problems caused by *S. aureus*, which leads to great economic losses in the dairy industry.¹

Recently, the emergence and the widespread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains became a real threat for international public health. This spread of MRSA led to the lack of efficient alternative therapeutic drugs in hospitals.² Beside human cases, MRSA was isolated from several species of animals such as mares suffering from metritis,^{3,4} wound infections,⁵⁻⁷ bovine mastitis⁸ and also from sick dogs, cats and rabbits.^{5,9,10} Recently, MRSA was isolated from the clonal lineage ST398 and ST9 in swine.¹¹ The transmission of MRSA between humans, animals and the environment was reported, where animals live in close contact with human MRSA carriers. Concerning the role of MRSA in the induction of mastitis, MRSA was found to be responsible for sporadic cases of mastitis in humans¹² and from cases of subclinical bovine mastitis.^{8,13} However, the strains isolated from cows could not be distinguished from those isolated from the workers in close contact.⁸

The possible transmission of MRSA from bovine subclinical mastitic milk to humans is a real concern due to widely use of cloxacillin for more than 30 years. This kind of semisynthetic penicillin is in use in many countries involved in the present study.

For rapid and accurate diagnosis of MRSA, different molecular and culture methods were developed.¹⁴⁻¹⁷

In the present study 68 out of 530 *S. aureus* strains isolated from four different countries in three continents were investigated phenotypically and genotypically for resistance against oxacillin and penicillin G. These strains were isolated from cows suffering from subclinical mastitis in Germany, Indonesia, Mexico and Brazil. The selection of the strains was based on size polymorphism of *coa* gene and Xr region of *spa* gene and profile heterogeneity through the use of macrorestriction analysis with pulsed field gel electrophoresis. Only strains with different genetic profiles were further researched.

The aim of the present work was to investigate the role of MRSA in the induction of bovine subclinical mastitis, and their impact in public health. Additionally the results of the present study give an update on the prevalence of penicillin G and oxacillin-resistant *S. aureus* isolates in bovine subclinical mastitis on the basis of genotypic strain selection.

Introducción

El *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos principales causantes de una gran variedad de serias enfermedades en humanos y animales. Entre los principales problemas causados por *S. aureus* está la mastitis, que ocasiona graves pérdidas económicas a la industria lechera.¹

Actualmente, la emergencia y la diseminación de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) han llegado a ser un fuerte problema para la salud pública internacional. La diseminación del MRSA ha causado ineficacia en el tratamiento alternativo antes efectivo con drogas terapéuticas en los hospitales.² Aparte de los casos en humanos, el MRSA fue aislado de varias especies animales tales como yeguas con metritis,^{3,4} infecciones de heridas,⁵⁻⁷ mastitis bovina,⁸ perros, gatos y conejos enfermos.^{5,9,10} Recientemente, el MRSA fue aislado de las líneas clonales ST398 y ST9 en cerdos.¹¹ La transmisión de MRSA se ha registrado entre humanos, animales y en el medio ambiente, en los lugares en los que existe un contacto estrecho entre animales y humanos portadores del MRSA. Respecto al papel del MRSA en el origen de la mastitis, se encontró que fue el causante esporádico en casos de mastitis en humanos¹² y de mastitis subclínica bovina.^{8,13} Sin embargo, las cepas aisladas de las vacas no pudieron ser diferenciadas de aquellas obtenidas de los trabajadores en contacto estrecho con animales.⁸

La posible transmisión del MRSA de bovinos con mastitis bovina subclínica a humanos al consumir éstos la leche contaminada, es un problema real, ya que ha habido uso extensivo de la cloxacilina durante más de 30 años. Este tipo de penicilina semisintética está en uso en los países involucrados en esta investigación.

Para un diagnóstico rápido y seguro del MRSA se han desarrollado diferentes métodos moleculares y de cultivo.¹⁴⁻¹⁷

En el presente estudio, de 530 cepas de *S. aureus* se seleccionaron 68, procedentes de cuatro países ubicados en tres continentes, para ser investigadas fenotípica y genotípicamente, y observar su resistencia a oxacilina y penicilina G. Esos aislamientos se obtuvieron de vacas afectadas con mastitis subclínica en Alemania, Indonesia, México y Brasil. La selección de los aislamientos tuvo como base el tamaño del polimorfismo del gen *coa* y del gen *spa* en su región Xr y la heterogeneidad del perfil, identificados mediante el análisis de macrorestricción con el uso de electroforesis en gel de campos pulsados. Únicamente fueron investigados los aislamientos con perfiles genéticos diferentes.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la diversidad genética de cepas del *Staphylococcus aureus*

Materials and methods

Bacterial isolation

Initially, 530 *S. aureus* isolates from four different countries of three continents were collected after cultivation¹⁸ (IDF 1982) of quarter milk samples from cows suffering from subclinical mastitis (somatic cell count* 100 000 cells/ml with no macroscopic signs of mastitis) on 5% Columbia sheep blood agar with 1% esculin.** This included strains from Germany (n=367), Indonesia (n=35), Mexico (n=41) and Brazil (n=87).

After primary isolation, a selection process of the strains was carried out according to their genetic relatedness. This was based on results of a DNA macrorestriction analysis,¹⁹ defined as were published.²⁰ Only genetically unrelated isolates identified by size polymorphism of *coa* and Xr region of the *spa* gene and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) were used in this study. In macrorestriction analysis they were classified as genetically unrelated if they showed a six band or greater difference and a dice coefficient of correlation of 60 % or less. Banding patterns were compared visually by two independent observers.

The identification of the cultures was performed by biochemical culture characteristics and by molecular methods. For primary characterization, tube coagulase test was carried out using EDTA treated rabbit plasma** by means of the direct tube test.²¹ The test was evaluated after four and 24 hours of incubation at 37°C. This was followed by a biochemical characterization using the commercial identification system API32 Staph.*** Finally, a molecular confirmation was performed by PCR amplification of species specific segments of genes 23s RNA, *nuc*, *coa*, *clfA* and *spa*.^{7,22-27} The used primers and cyler programs are listed in Table 1.

Polymerase Chain Reaction

PCR was applied for confirmation of the isolates as *S. aureus* through the detection of *S. aureus* specific sequences^{1,28} and to investigate the strains for the presence of the *blaZ* and *mecA* antibiotic resistance gen.^{30,31} The strains used for control purposes were *S. aureus* ATCC 27626 and *S. aureus* ATCC 25923, respectively.

For extraction of genomic DNA, five freshly subcultured *S. aureus* colonies were selected and suspended in 50 µl TE buffer solution (10 mM of Tris HCl/L, 1 mM of EDTA/L, pH 8.0), followed by the addition of 1 µl lysostaphin (1.8 U/l). The solution was kept at 37°C for 60 min. After 60 min, 1 µl proteinase K (15.1 mg/ml) was added and the suspension incubated for 2 h at 56°C. For inactivation of proteinase K, the suspension

aisladas de mastitis subclínica bovina, y su impacto en la salud pública. Además, los resultados de este estudio actualizarán la prevalencia de *S. aureus* resistente a penicilina G y oxacilina, aislado de mastitis subclínica, con base en una selección genotípica de cepas.

Material y métodos

Aislamientos bacterianos

Inicialmente se recolectaron 530 cepas de *S. aureus* de cuatro países correspondientes a tres continentes, tomadas de cultivos¹⁸ de muestras de leche de un cuarto de la ubre de vacas afectadas con mastitis subclínica (conteo de células somáticas* $\geq 100,000$ células/ml, sin signos macroscópicos de mastitis) en agar sangre de borrego Columbia al 5% con 1% de esculina.** Se incluyeron aislamientos de Alemania (n = 367), Indonesia (n = 35), México (n = 41) y Brasil (n = 87).

Después del aislamiento primario, se llevó a cabo un proceso de selección de las cepas de acuerdo con sus relaciones genéticas. El proceso se basó en los resultados del análisis de macrorestricción del ADN,¹⁹ considerando publicaciones anteriores.²⁰ Sólo se utilizaron en este estudio los aislamientos que no estaban relacionados genéticamente, identificados mediante el tamaño del polimorfismo del gen *coa* y de la región Xr del gen *spa*, y por la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). La clasificación genética para observar que no hubiese relación entre los aislamientos, se hizo por análisis de macrorestricción; se definía que no había relación genética cuando mostraban una diferencia en seis o más bandas y un coeficiente de variación de correlación de 60% o menor. Los patrones de bandeo fueron comparados visualmente por dos observadores independientes.

La identificación de los cultivos se hizo mediante las características bioquímicas del cultivo y aplicando métodos moleculares. Para la caracterización primaria se efectuó la prueba de coagulasa en tubo, utilizando plasma de conejo con EDTA,** mediante la prueba directa en tubo.²¹ La prueba fue evaluada a las 4 h y 24 h después de haber sido incubada a 37°C. Enseguida se realizó la caracterización bioquímica usando el sistema de identificación comercial API32Staph.*** Se realizó una confirmación molecular mediante la amplificación por PCR de los segmentos específicos de especie de los genes 23S RNAr, *nuc*, *coa*, *clfA* y *spa*.^{7,22-27} Los iniciadores u oligonucleótidos usados y los programas de ciclos se enlistan en el Cuadro 1.

*Fossomatic, Aarhus, Dinamarca.

**Merck, Darmstadt, Alemania.

***BioMerieux, Nürtingen, Alemania.

CUADRO 1

Lista de los iniciadores usados, de programas de termociclador, tamaño de amplicones y referencias de las reacciones de PCR aplicadas en el presente trabajo

List of used primers, thermocycler-programs, amplicon sizes and references of the applied PCR reactions in the present work

Gene	Primer sequence	Program	Amplicon size	Reference
23S rRNA	F:ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC R:AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	37 × 94°C-40s, 64°C-60s, 72°C-75s	1251	22
nuc	F:GCG ATT GAT GGT GAT ACG GT R:AGC CAA GCC TTC ACG AAC TAA AGC	37 × 94°C-60s, 55°C-30s, 72°C-30s	280	23
coa	F:ATA GAG ATG CTG GTA CAG G R:GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	30 × 94°C-60 s, 58°C-60s, 72°C-60s	Variable	25
spa (Xr-region)	F:CAA GCA CCA AAA GAG GAA R:CAC CAG GTT TAA CGA CAT	30 × 94°C-60s, 60°C-60 s, 70°C-60s	Variable	24
mecA	1 :AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 2:ACT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	40 × 94 °C-30s, 55°C-30s, 72°C-1min	533	30
blaZ	1:ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC 2:TGA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	40 × 94°C-30 s, 55°C-30s, 72°C-1 min	173	29

was boiled for 10 min, followed by centrifugation at 10 000 *g* for 5 min. Finally, the supernatant was cooled at 4°C on ice before being used in the PCR. The PCR reaction mixture (20 µl) contained 0.7 µl from both primers (10 pm/µl), 0.4 µl the deoxynucleoside triphosphate (10 mM /l; MBI), 2.0 µl of 10 x thermophilic buffer, 1.2 µl of MgCl₂ (25 mM /l), 0.1 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl), and 12.9 µl of distilled water. Finally, 2.0 µl of DNA sample was added. For the visualization of the PCR products, electrophoresis of 10 µL of each reaction product was loaded on a 2% agarose gel with 1 x TAE buffer (40 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA/L, 1.14 µl/l glacial acetic acid, pH 7,8) at 70 - 100 voltage, followed by gel staining for 5 min with 5 µl/ml ethidium bromide solution.* The amplicons were visualized under an UV transilluminator.**

Detection of genetically unrelated strains

Together with size polymorphism of gene *coa* and Xr region of the gene *spa*, macrorestriction analysis by Pfgc was applied for the selection of genetically unrelated strains. Chromosomal DNA of *S. aureus* isolates were digested with the restriction enzyme *Sma*I and the fragments were separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ¹⁹ by the use of the Chef-Dr II pulsed-field electrophoresis system.** Only strains which had

Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

La PCR se utilizó para confirmar los aislamientos de *S. aureus* por medio de detección de las secuencias específicas de *S. aureus*,^{1,28} y para investigar en las cepas la presencia de los genes *blaZ* y *mecA* resistentes a los antibióticos.^{30,31} Las cepas utilizadas como testigo fueron *S. aureus* ATCC 27626 y *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente.

Para la extracción del ADN genómico se tomaron cinco colonias recién subcultivadas de *S. aureus* y fueron suspendidas en 50 µl de solución amortiguadora TE (10 mM de Tris HCl/l, 1 mM de EDTA/l, pH 8.0). Enseguida se agregó 1 µl de lysostafina (1.8 U/l). La solución fue incubada a 37°C durante 60 min. Después de 60 min se le agregó 1 µl de proteinasa K (15.1 mg/ml) y la suspensión fue incubada durante 2 h a 56°C. Para inactivar la proteinasa K se hirvió la suspensión durante 10 min y luego se centrifugó a 10 000 *g* durante 5 min. Finalmente, el sobrenadante fue enfriado a 4°C en hielo, para después utilizarlo en la PCR. La mezcla de reacción para la PCR (20 µl) contenía 0.7 µl de ambos iniciadores (10 pm/µl), 0.4 µl de trifosfato deoxinucleósido (10 mM/l; MBI), 2.0 µl de 10 x amortiguador termofílico, 1.2 µl de MgCl₂ (25 mM/l), 0.1 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl),

differences in size polymorphism of the gene *coa* and Xr region of the gene *spa* and restriction patterns with at least 6 different fragments, as well as a dice coefficient of correlation of 60 % or less²⁰ were considered as genetically unrelated isolates and were included in the present work.

Screening for antibiotic resistance

Phenotypical and genotypical penicillin G-/oxacillin-resistance detection was carried out by the standard disc diffusion method³⁰ and the molecular approach by PCR,^{29,30} respectively. The determination of the sensitivity of the strains to these antibiotics was performed by culture of *S. aureus* isolates in Mueller-Hinton broth*** for 4 h at 37°C. Subsequently, 10 µl of the suspension was plated on Mueller-Hinton agar.*** Thereafter, an antibiotic disk containing 10 IU penicillin G or 1 mg of oxacillin was placed in the centre of the plate. The agar plates were incubated for 24 h at 37°C. The inhibition zone of bacterial growth around the disk was measured and compared to the values established by the test. The test results were interpreted according to National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines.¹⁸ Oxacillin resistant *S. aureus* strains were additionally inoculated on BBL Chromagar MRSA. The plates were incubated aerobically at 37°C and examined after 24 hours according to the manufacturer's instructions. MRSA* appeared as mauve in color, other colonies as white, blue or blue-green. For verification of the phenotypically received results by these phenotypic techniques the determination of MIC was additionally performed using Vitek II system.**

Results

The 530 *S. aureus* strains from mastitic milk samples were identified by the use of the plasmacoagulase-test and the commercial identification system API 32Staph. This was confirmed genotypically by PCR amplification of *S. aureus* specific gene segments encoding the 23S rRNA, thermostable nuclease (*nuc*), clumping factor (*clfA*) and coagulase (*coa*) and the gene segments encoding the Xr respective region and the IgG binding region of protein A (*spa*). Depending on the size polymorphism of gene *coa* and Xr-region of gene *spa* and according to macrorestriction profiles (Figure 1), 68 unrelated *S. aureus* strains were further investigated for their antibiotic sensitivity.

The results of the penicillin G- and oxacillin resistance-test are shown in Table 2. Forty field strains were resistant to penicillin G determined by phenotypic and genotypic methods, ten isolates were genotypically *blaZ*-gene positive (Figure 2). The genotypic

y 12.9 µl de agua destilada. Finalmente, se agregaron 2.0 µl de la muestra de ADN. Para la visualización de los productos de la PCR se hizo una electroforesis de 10 µl de cada producto de la reacción en un gel con 2% agarosa en solución amortiguadora 1X TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA/l, 1.14 µl/l ácido acético glacial, pH 7.8) con un voltaje de 70-100, enseguida se tiñó el gel durante 5 min en 5 µl/ml de solución de bromuro de etidio.* Los amplicones fueron visualizados en un transiluminador UV.**

Detección de cepas no relacionadas genéticamente

Junto con la medición del polimorfismo del gen *coa* y la región Xr del gen *spa*, se efectuó el análisis de macrorestricción por PFGE para seleccionar las cepas no relacionadas genéticamente. El ADN cromosomal de *S. aureus* se digirió con la enzima de restricción *SmaI* y los fragmentos se separaron utilizando la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE),¹⁹ con el uso del sistema de electroforesis de campos pulsados Chef-Dr II.** Solamente se consideraron genéticamente no relacionados los aislamientos que tenían diferencias en el tamaño del polimorfismo del gen *coa* y en la región Xr del gen *spa* y que tenían patrones de restricción con al menos seis fragmentos diferentes, así como un coeficiente de variación de correlación de 60% o menor.²⁰ Estos aislamientos se incluyeron en la presente investigación.

Control de la resistencia a antibióticos

La detección de la resistencia fenotípica y genotípica a la penicilina G y la oxacilina se realizó aplicando el método de la difusión estándar en disco³⁰ y la prueba molecular con la PCR,^{29,30} respectivamente. La determinación de la sensibilidad de los aislamientos a los antibióticos antes mencionados se realizó haciendo cultivo de las cepas de *S. aureus* en caldo de Mueller-Hinton*** durante 4 h a 37°C. Subsecuentemente, 10 µl de la suspensión fue inoculada en agar Mueller-Hinton.*** Enseguida se colocó un disco con antibiótico, que contenía 10 UI de penicilina G o 1 mg de oxacilina en el centro del medio de cultivo. Los medios de agar se incubaron durante 24 h a 37°C. Se midió la zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco y se comparó con los parámetros establecidos para estas pruebas. Los resultados de las pruebas se interpretaron de acuerdo con las normas del National Committee for Clinical Laboratory Stan-

*Sigma, Taufkirchen, Alemania.

**Bio-Rad, Munich, Alemania.

***Merck, Darmstadt, Dinamarca.

investigation for the presence of gene *mecA* among the 68 investigated *S. aureus* strains revealed the presence of the gene in a single isolate originating from Brazil (Figure 3). However, this field strain was according to the results achieved by the use of BBL-Chromoagar, standard disc diffusion methods and MIC determination sensitive to oxacillin. In contrast to oxacillin-resistance and *mecA* gene, the genotypic and phenotypic examination of penicillin G-resistance and gene *blaZ* showed otherwise the spread of *blaZ* gene among the selected strains of four countries from three continents. In total, most of the investigated *S. aureus* strains harboured *blaZ* gene, 50 (73.5%). In detail, 18 (65.2%) German, 11 (68.75%) Mexican, 8 (80.0%) Indonesian and 13 (81.3%) Brazilian field strains were positive for *blaZ*-gene. In contrast, only 30 (58.8%) isolates were phenotypically penicillin G resistant. The exact distribution was: 10 (38.5%) field strains in Germany, 5 (13.3%) in Mexico, 5 (50%) in Indonesia and 10 (62.4%) in Brazil.

Discussion

The β -lactam antibiotics represent one of the most widely used antimicrobial agents for the treatment of bovine mastitis. The aim of the present study was to investigate the possible role of MRSA in the induction of bovine mastitis, and to compare the efficiency of MRSA specific PCRs and the time consuming MRSA selective medium in detecting MRSA-positive strains, as well as β -lactam antibiotics, by phenotyping and genotyping methods. To achieve these two aims, 68 genetically unrelated isolates representing 68 herds out of 530 *S. aureus* field strains from four countries were included in the present work. The 68 strains showed heterogenic genetic profiles as determined by size polymorphism of the *coa* and *Xr* region of the *spa* gene and macrorestriction analysis by PFGE. Previous isolation of MRSA from human cases was reported in Indonesia,^{15,32} Mexico,^{16,33} Brazil³⁴⁻³⁷ and in Germany.³⁸ With the exception of Germany,³⁹ MRSA has not been able to be isolated from mastitic cows. In the present work, one strain isolated from bovine mastitis showed to be *mecA* gene positive, which could not be confirmed phenotypically. The origin of this MRSA isolate was unclear. In previous reports about the isolation of MRSA in veterinary samples^{8,40} as well as food samples,⁴¹ it was concluded that the isolates were not of animal origin and were most likely from humans who were in close contact with these animals. Additionally, other studies reported about a possible transfer of *S. aureus* between humans and cattle.^{42,44} The origin of the *mecA* positive strain described in the present work could not be identified. Previous works compared the

dards.¹⁸ Las cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina también fueron inoculadas en BBL Cromoagar MRSA.* Los medios se incubaron de forma aerobia a 37°C y se leyeron después de 24 horas. Los MRSA tuvieron una coloración violeta y las otras colonias un color blanco, azul o azul-verde. Para verificar los resultados fenotípicos obtenidos, adicionalmente se determinó la concentración mínima inhibitoria MIC utilizando el sistema Vitek II.**

Resultados

Las 530 cepas de *S. aureus* de muestras de leche con mastitis fueron identificadas con el uso de la prueba de plasmacoagulasa y el sistema comercial de identificación API 32 Staph. Ello se confirmó fenotípicamente por la amplificación, mediante la PCR, de los segmentos específicos de *S. aureus*, que codifican para los genes 23S rRNA, nucleasa termoestable (*nuc*), *clumping factor* o factor aglutinante (*clfA*), coagulasa (*coa*) y el segmento del gen que codifica para la región respectiva *Xr* y la región enlazante de IgG de la proteína A (*spa*). Dependiendo del tamaño del polimorfismo del gen *coa* y la región *Xr* del gen *spa*, y de acuerdo con los perfiles de macrorestricción mediante PFGE (Figura 1), como resultado de este estricto proceso se seleccionaron 68 aislamientos de *S. aureus* de los 530 aislamientos de campo iniciales, para continuar con las investigaciones. Finalmente se seleccionaron 26 aislamientos de Alemania, 16 de Indonesia, 16 de México y 10 de Brasil.

De acuerdo con los resultados de la resistencia a penicilina G y a oxacilina (Cuadro 2), 40 cepas mostraron mediante métodos fenotípicos resistencia a la penicilina G y 50 cepas fueron positivas genotípicamente al gen *blaZ* (Figura 2). La investigación genotípica para detectar el gen *mecA* en las 68 cepas de *S. aureus* analizadas reveló la presencia del gen sólo en un aislamiento originario de Brasil (Figura 3), si bien este resultado no concuerda con resultado negativo obtenido mediante el método estándar de difusión en disco de BBL-Cromoagar y la determinación de MIC sensible a oxacilina, por Vitek II.

En contraste a la resistencia a oxacilina y el gen *mecA*, el examen genotípico y fenotípico de la resistencia a penicilina G y al gen *blaZ*, la mayoría de las cepas de *S. aureus* mostraron la diseminación del gen *blaZ*, al hacer la prueba genotípica por PCR. En la mayoría de las cepas de *S. aureus* investigadas se localizó el gen *blaZ* 50 (73.5%). Detalladamente, 18 cepas de Alemania (65.2%), 11 de México (68.75%), 8 de Indonesia (80.0%) y 13 de Brasil (81.3%) fueron positivas al gen

*BBL; Becton Dickinson, Sparks, MD.

**BioMerieux, Nürtingen, Alemania.

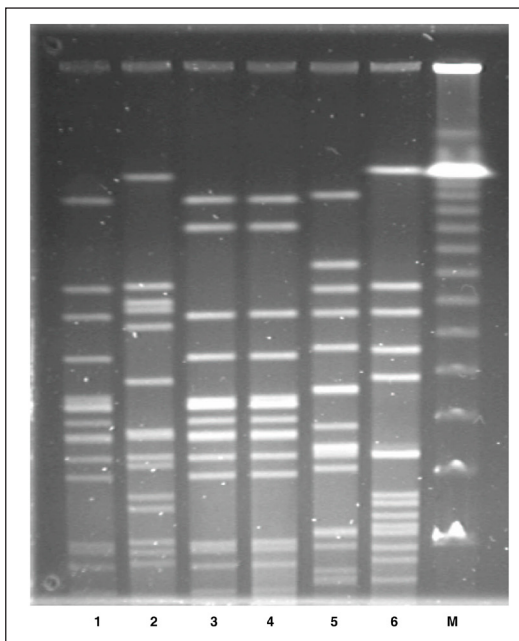


FIGURA 1. PFGE, patrón de restricción del ADN cromosomal de 6 cepas aisladas de *S. aureus* después de la digestión con la enzima de restricción *SmaI*. M = marcador de peso molecular (Marcador de PFGE cargado lambda, 50-1,000 Kb, Sigma +).

FIGURE 1. PFGE chromosomal DNA restriction pattern of six *S. aureus* isolates after digestion with the restriction enzyme *SmaI*. M= molecular weight marker (lambda ladder PFGE marker, 50-1,000 Kb, Sigma+).

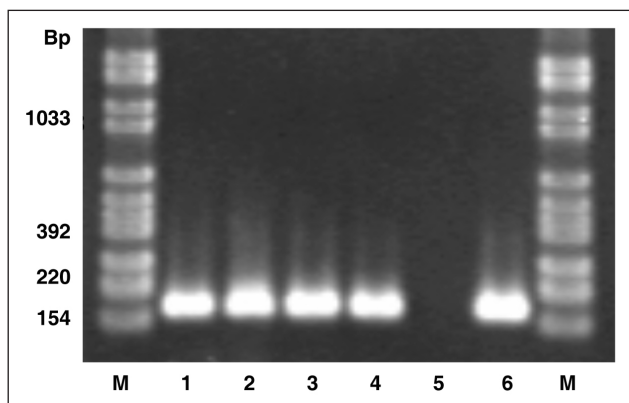


FIGURA 2. Amplificados de los genes que codifican la β -lactamasa (*blaZ*) del *S. aureus* con un tamaño de 170 pb (*blaZ* carriles 1-4), carril 5 control negativo, carril 6: control positivo, M: marcador de peso molecular del ADN (Serva DNA standard pBR328Mix, Heidelberg, Germany).

FIGURE 2. Amplicons of the genes encoding staphylococcal β -lactamase (*blaZ*) of *S. aureus* with size of 170 bp (*blaZ* lanes 1-4), lane 5 negative control, lane 6: positive control, M: DNA molecular weight marker (Serva DNA standard pBR328Mix, Heidelberg, Germany)

use of molecular and *in-vitro* culture methods for determination of antibiotic resistance.^{14,17,45} The recommendations given by these authors are unclear. While van Hal *et al.*¹⁷ reported that molecular methods were

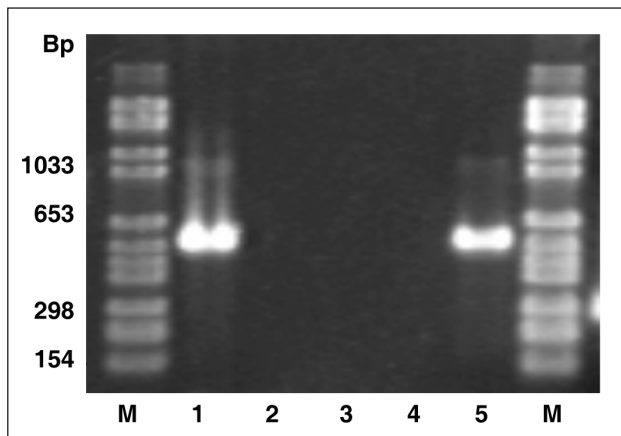


FIGURA 3. Amplificados de los genes que codifican la resistencia de estafilococcica a meticilina (*mecA*) de *S. aureus* con un tamaño de 530 pb (carril 1: cepa positiva a *mecA* cepa de campo de Brasil) carriles 2-4: cepas negativas, carril 5: control positivo M: marcador de peso molecular del ADN (Serva DNA standard pBR328Mix, Heidelberg, Germany).

FIGURE 3. Amplicons of the genes encoding staphylococcal methicillin resistance (*mecA*) of *S. aureus* with size of 530 bp (lane 1 positive *mecA* field strain from Brazil) lanes 2-4: negative strains, lane 5: positive control M: DNA molecular weight marker (Serva DNA standard pBR328Mix, Heidelberg, Germany).

blaZ. En contraste, en el análisis fenotípico, únicamente 40 cepas (58.8%) fueron resistentes a la penicilina G. La distribución detallada fue: 10 cepas de campo en Alemania (38.5%), 5 en México (13.3%), 5 en Indonesia (50%) y 10 en Brasil (62.4%).

Discusión

Los antibióticos β -lactámicos son los agentes antimicrobianos más ampliamente utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina. El objetivo del estudio fue investigar la presencia de diferentes linajes genéticos del *Staphylococcus aureus*, su papel en el origen de la mastitis bovina, y comparar la eficiencia de las PCR específicas de MRSA con la de los medios selectivos para MRSA, que requieren más tiempo para la detección de los aislamientos positivos a MRSA, así como también a los antibióticos β -lactámicos, por métodos fenotípicos y genotípicos. Para lograr ese propósito se incluyeron en el presente estudio 68 cepas aisladas de *S. aureus* sin relación genética alguna, que representaban 68 hatos de 530 aislamientos de *S. aureus* provenientes de cuatro países. Las 68 cepas mostraron perfiles genéticos heterogéneos, como se observó mediante el uso del tamaño del polimorfismo del gen *coa*, de la región *Xr* del gen *spa*, y del análisis de macrorestricción por PFGE. El aislamiento previo de MRSA en casos de humanos se realizó en Indonesia,^{15,32} México,^{16,33} Brasil³⁴⁻³⁷ y Alemania.³⁸ A excepción de Alemania,³⁹ el MRSA no

CUADRO 2

Resistencia fenotípica y genotípica a penicilina G y oxacilina del *S. aureus* aislado de mastitis subclínica bovina de diferentes orígenes geográficos

Phenotypic and genotypic penicillin G- and oxacillin- resistance of *S. aureus* isolated from bovine subclinical mastitis of different geographical origin

Origin Country	No of Strains	Genotypic resistance <i>mecA</i>	Genotypic resistance <i>blaZ</i>	Phenotypic resistance** Penicillin	Phenotypic resistance* Oxacillin
Germany	26	0	18 (65.2%)	10 (38.5%)	0
Mexico	16	0	11 (68.75%)	5 (13.3%)	0
Brazil	10	1	8 (80%)	5 (50%)	0
Indonesia	16	0	13 (81.3%)	10 (62.4%)	0
Total	68	1 (1.5%)	50 (73.5%)	40 (58.8%)	0

* Standard disc diffusion test, BBL- Chromoagar, MIC- determination (Vitek II).

** Standard disc diffusion test.

found to be more accurate for the detection of MRSA than the conventional agar-based methods, Flayhart *et al.*¹⁴ indicated that the use of C-MRSA is confidential and more trustworthy than other methods with an overall specificity of 99.7% in this study. The obtained results by phenotypic examination of oxacillin resistance and the molecular detection of *mecA* gene were comparable. But there was a great variation between the use of phenotyping and genotyping methods for the detection of penicillin G resistance. The presented data disagree with the results of Flayhart *et al.*¹⁴ who reported (97.6%) agreement between different molecular and culture methods. On the other hand, although the use of molecular methods is limited due to their high costs, the use of PCR saves time as the results can be obtained in 2-3 hours compared with 18-24 hours needed by culture method.¹⁷ Alternatively, data presented here indicate the need to combine the use of different methods for an accurate diagnosis. This is recommended due to the confusion and great variation between both phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance as seen in the present work, and also the detection of false positive and negative culture results as reported previously.⁴⁶

The present data support other published data concerning the complete absence or the low incidence of MRSA in dairy samples. This indicates that MRSA has not yet emerged as a major pathogen in dairy herds, despite long-term use of semisynthetic penicillins in this therapeutic area. The low incidence of detected MRSA strains in milk samples suggest the possible contamination of the milk samples by human or environmental strains.

ha podido ser aislado de vacas con mastitis. En la presente investigación se encontró únicamente una cepa positiva al gen *mecA*, aislada de un caso de mastitis bovina, pero fenotípicamente fue negativa. El origen de este aislamiento de MRSA no fue claro. En informes previos sobre aislamientos de MRSA de muestras veterinarias^{8,40} y de muestras de alimentos,⁴¹ se concluyó que esos aislamientos no eran de origen animal, la mayoría procedía de humanos que estaban en contacto cercano con animales. Además hay otros estudios que informan sobre la posibilidad de una transmisión de *S. aureus* de humanos a bovinos.⁴²⁻⁴⁴ El origen de la cepa positiva de *mecA*, descrita en la presente investigación, no pudo ser identificado. Investigaciones anteriores compararon el uso de los métodos de cultivo con los moleculares *in vitro* para la determinación de la resistencia a antibióticos.^{14,17,45} Las recomendaciones dadas por esos autores no son claras. Mientras que Van Hal *et al.*¹⁷ informan que los métodos moleculares fueron más confiables para detectar el MRSA que los métodos convencionales basados en agares, Flayhart *et al.*¹⁴ indican que el uso del C-MRSA es confiable y más seguro que otros métodos, ya que alcanza un promedio de especificidad de 99.7% en esa investigación. En los presentes resultados el análisis fenotípico de resistencia a oxacilina y la detección molecular del gen *mecA* fueron comparables. Pero pudo observarse una gran variación entre los métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de la resistencia a penicilina G. Los presentes resultados no concuerdan con los resultados obtenidos por Flayhart *et al.*,¹⁴ quienes registraron 97.6% de coincidencia entre los diferentes métodos moleculares y de cultivo. Por otra parte, si bien el uso de los métodos moleculares es limitado debido a los altos costos de la PCR, ahorra tiempo, ya que los resultados pueden obtenerse en 2 o 3 horas, que son muy pocas, comparadas con las 18 a 24 horas necesarias para los

Referencias

- EL-SAYED A, ALBER J, LAEMMLER Ch, JAEGER S, WOLTER W, CASTAÑEDA VH. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet Mex* 2006; 37: 165-179.
- WALDVOGEL FA. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: MANDELL GL, BENETT JE, DOLIN R, MANDELL DS, editors. *Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Disease*. New York: Churchill Livingstone: 1754-1777.
- ANZAI T, KAMADA M, KANEMARU T, SHUGUTA S, SHIMIZU A, HIGUCHI T. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from mares with metritis and its zoopidemiology. *J Equine Vet Sci* 1996; 7: 7-11.
- SHIMIZU A, JAWANO J, YAMAMOTO CH, KAKUTANI O, ANZAI T, KAMADA M. Genetic analysis of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulse-field-gel- electrophoresis. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 935-937.
- RICH M, ROBERTS L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Vet Rec* 2004; 154: 310.
- SEGUIN JC, WALKER RD, CARON JP, KLOOS WE, GEORGE CG, HOLLIS RJ *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital. Potential human to animal transmission. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1459-1463.
- STEPHAN R, ANNEMÜLLER C, HASSAN AA, LÄMMLER CH. Characterization of eneterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in North-east Switzerland. *Vet Microbiol* 2001; 78: 373-382.
- JUHAZ-KASZANVITZKY E, JANOSI S, SOMOGVI P, DAN A, VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS L, VAN DUIJKEREN E *et al*. MRSA transmission between cows and humans. *Emer Infect Dis* 2007; 13: 630-632.
- GORTEL K, CAMPBELL KL, KAKOMA I, WHITTEM T, SCHAEFFER DJ, WEISIGER RM. Methicillin-resistance among *Staphylococci* isolated from dogs. *Am J Vet Res* 1996; 60: 1562-1530.
- TOMLIN JM, PEAD J, LLOYD DH, HOWELL S, HARTMAN F, JACKSON HA *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. *Vet Rec* 1999; 144: 60-64.
- KEHRENBURG C, CUNY C, STROMMINGER B, SCHWARZ S, WITTE W. Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 779-781.
- SCHOENFELD EM, MCKAY MP. Mastitis and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the calm before the storm? *J Emerg Med* 2010; 38: 31-34.
- DEVRIESE LA, HOMMEZ F. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci* 1975; 19: 23-27.
- métodos de cultivo.¹⁷ Alternativamente, los datos aquí presentados indican la necesidad de combinar el uso de diferentes métodos para lograr un diagnóstico seguro. Además, se recomienda debido a la confusión y a la gran variación encontradas entre la detección fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos –como se confirma en el presente trabajo–, y también por la detección de falsos positivos y de resultados de cultivo negativos, como se ha informado previamente.⁴⁶
- La presente investigación apoya a otras publicaciones que mencionan la ausencia de MRSA o su incidencia muy baja en muestras de leche. Ello indica que el MRSA actualmente no es un patógeno principal en el ganado bovino lechero, a pesar de que durante mucho tiempo se han utilizado las penicilinas semisintéticas en la terapia de mastitis. La baja incidencia de aislamientos de MRSA en muestras de leche sugiere una posible contaminación de las muestras de leche por cepas de humanos o medioambientales.
- FLAYHART D, HINDLER J, BRUCKNER D, HALL G, SHRESTHA R, VOGEL SH *et al*. Multicenter evaluation of BBL CHROMagar MRSA medium for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from surveillance cultures of the anterior nares. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5536-5540.
- CHONGTRAKOOL P, ITO T, MA X, KONDO Y, TRAKULSOMBOON S, TIENSASITORN CH *et al*. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)*. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian Countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1001-1012.
- ECHANIZ-AVILES G, VELAZQUEZ-MEZA M E, AIRES-DE-SOUSA M, MORFIN-OTERO R, RODRIGUEZ-NORIEGA E, CARNALLA-BARAJAS N *et al*. Molecular characterization of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone in a Mexican hospital (1999-2003). *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 22-28.
- VAN HAL SJ, STARK D, LOCKWOOD B, MARRIOTT D, HARKNESS J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: Comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2486-2490.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for disk diffusion: approved standard M2-A8: performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Wayne (PA): The Committee, 2003.
- TOSHKOVA K, SAVOY A, SOEDARMANTO L, LÄMMLER CH, CHANKOVA D, VAN BELKUM A *et al*. Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carriers. *Zentralbl Bakteriol* 1997; 286: 547-559.

20. TENOVER FC, ARBEIT R, ARCHER G, BIDDLE J, BYRNE S, GOERDING R *et al.* Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1995; 32: 407-415.
21. HARMON RJ, EBERHARDT RJ, JASPER DE, LANGLOIS BE, WILSON RA. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections. 3rd ed. Arlington, VA: National Mastitis Council, 1990.
22. STRAUB JA, HERTEL C, HAMMES WP. A 23S rRNA-targeted polymerase chain reaction- based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy product. J Food Prot 1999; 62: 1150-1156.
23. BRAKSTAD OG, AASBAKK K, MAELAND JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase chain reaction, amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol 1992; 30: 1654-1660.
24. FRENAY H ME, BUNSCHOTEN LM, SCHOULS WJ V, LEEUWEN CMJ, GRAULS EV, VERHOEF J *et al.* Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 60-64.
25. HOOKEY J, RICHARDSON VJF, COOKSON BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus*. Basis on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J Clin Microbiol 1998; 36: 1083-1089.
26. AKINEDEN Ö, ANNEMÜLLER C, HASSAN A A, LÄMMLER CH, WOLTER W, ZSCHÖCK M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 959-964.
27. EL-SAYED A, ALBER J, LÄMMLER CH, BONNER B, HUHNS A, KALETA EF *et al.* PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from birds. J Vet Med 2005; 52: 38-44.
28. REINOSO EB, EL-SAYED A, LÄMMLER CH, BOGNI C, ZSCHÖCK M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiol Res 2006; 163: 314-322.
29. MARTINEAU F, PICARD FJ, GRENIER L, ROY PH, OUELLETTE M, TRIAL E *et al.* Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 527-533.
30. LEE JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 6489- 6494.
31. BARRY AL, FUCHS PC, ALLEN SD, THORNSBERRY C, GERLACH EH, JONES N. Quality control limits for the standard anaerobic reference agar dilution susceptibility test procedure of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. J Clin Microbiol 1989; 27: 192-195.
32. SEVERIN JA, LESTARI E S, KUNTAMAN K, MELLES D C, PASTINK M, PEETERS JK *et al.* Antimicrobial resistance in Indonesia, prevalence and prevention study group. Unusually high prevalence of Pantone-Valentine leukocidin genes among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains carried in the Indonesian population. J Clin Microbiol 2008; 46: 1989-1995.
33. VELAZQUEZ-MEZA ME, DE SOUSA M, ECHANIZ-AVILES G, SOLORZANO-SANTOS F, MIRANDA-NOVALES G, SILVA-SANCHEZ *et al.* Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric Hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. J Clin Microbiol 2004; 42: 3877-3880.
34. WEY SB, CARDO DM, HALKER E, CARRATU FP, SAES AC. Distribution and analysis of 8.268 nosocomial infections at the Hospital São Paulo: 1985-1989. Rev Hosp São Paulo 1990; 1: 169-174.
35. SADER HS, PIGNATARI AC, HOLLIS RJ, LEME I, JONES RN. Oxacillin- and quinolone- resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. Infection control and hospital epidemiology. Infect Control Hosp Epidemiol 1993; 14: 260-264.
36. CALAFFA FILHO MP, LIMASI, SINTO A, ANDRIOLO A, MENDES CMF. Avaliação da sensibilidade à teicoplanina e vancomicina, em *Staphylococcus aureus* estafilococos coagulase negativos. Rev Assoc Med Bras 1994; 40: 77-80.
37. TRINDADE PA, MCCULLOCH JA, OLIVEIRA GA, MAMIZUKA EM. Molecular techniques for MRSA typing: Current issues and perspectives. Braz J Infect Dis 2003; 7: 32-43.
38. SCHMITZ FJ, STEIERT M, TICHY HV, HOFMANN B, VERHOEF J, HEINZ HP *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Düsseldorf by six genotypic methods. J Med Microbiol 1998; 47: 341-351.
39. MONECKE S, KUHNERT P, HOTZEL H, SLICKERS P, EHRLICH R. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. Vet Microbiol 2007; 125: 128-140.
40. HARMON FA, TROSTLE SS, KLONEN AA. Isolation of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. J Am Vet Med Assoc 1997; 211: 590-592.
41. KITAI S, SHIMIZU A, KAWANO J, SATO E, NAKANO C, UJI T *et al.* Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. J Vet Med Sci 2005; 67: 107-110.
42. FOX LK, GERSHMANN M, HANCOOK DD, HUTTON CT. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time hygiene practices. Cornell Vet 1991; 81: 183-193.
43. ROBERSON L, FOX K, HANCOOK DD, GAY JM, BESSER TE. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci 1994; 77: 3354-3364.
44. ZADOKS R, VAN LEEUWEN W, BARKEMA H, SAMPIMON O, VERBRUGH H, SCHUKKEN Y H *et al.* Application of Pulse-field-gel electrophoresis

and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 2000; 38: 1931-1939.

45. FARLEY J, STAMPER PD, ROSS T, SPESER S, CAI M, CARROLL KC. Comparison of the IDI-MRSA™ assay to culture using BBL™ CHROMagar™ MRSA for detection of MRSA from nasal surveillance cultures

in an at-risk population. 107th General Meeting of the American Society for Microbiology; 24 March 2007; Toronto, Canada. Toronto, Canada: American Society for Microbiology, 2007:1-4.

46. PAPE J, WADLIN J, NACHAMKIN I. Use of BBL CHROMagar MRSA medium for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures. J Clin Microbiol 2006; 44: 2575-2576.