

Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México

Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico.

Amir El-Sayed* Joachim Alber* Christoph Lämmli* Sybille Jäger**
Wilfried Wolter** Hugo Castañeda-Vázquez***

Abstract

Mastitis is one of the major problems challenging the dairy industry worldwide. Among the various organisms causing mastitis, *Staphylococcus aureus* is considered to be one of the main pathogens causing this disease. In the present study 40 *S. aureus* isolated from milk samples of clinical and subclinical mastitic cows from different farms in one area in Mexico, were genotypically compared. Using 62 different oligonucleotide primers and PCR reactions were carried out to detect genes for a number of staphylococcal exoproteins, cell surface proteins, and two classes of the accessory regulator gene Agr. The investigated *S. aureus* were uniformly positive for the gene segment encoding a *S. aureus*-specific part of the 23S rRNA, the genes encoding thermostable nuclease (nuc), clumping factor (clfA), coagulase (coa) and the gene segments encoding the Xr repetitive region and the IgG binding region of protein A (spa). All tested strains were additionally positive for the hla, fnbA, ebpS and set1 genes and negative for the sbi, sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sej, tst, eta and etb genes. The remaining genes, including hlb, fnbB, cna (Domain A and B), cap5, cap8, agr class I, agr class II and sei were detected in a variable number of isolates. Significant differences between the *S. aureus* strains isolated from clinical and subclinical cases could be observed in the size of gene clfA, in the distribution of amplicon sizes of gene coa and the Xr-encoding gene segment of gene spa and in the occurrence of the genes hlb, fnbB, agr class I and agr class II, respectively.

Key words: GENOTYPIC CHARACTERISTICS, MASTITIS, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Resumen

La mastitis constituye uno de los principales problemas que enfrenta en el ámbito mundial la industria lechera. Entre los diferentes microorganismos causantes de mastitis, el *Staphylococcus aureus* se considera como uno de los principales agentes patógenos que provocan la enfermedad. En la presente investigación fueron comparadas genotípicamente 40 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica de varios establos en una región de México. Con el fin de detectar genes para diferentes exoproteínas de estafilococos, proteínas celulares de superficie y dos clases del gen regulador accesorio agr, se usaron 62 cebadores oligonucleotídicos diferentes y la técnica de PCR. Los *S. aureus* investigados resultaron uniformemente positivos para el segmento del gen 23S rARN, que codifica una parte específica del *S. aureus*, y los genes que codifican para la nucleasa termoestable (nuc), el factor aglutinante o *clumping factor* (clfA), la coagulasa (coa) y los segmentos de gen que codifican la región repetitiva Xr y el sitio enlazante de la IgG, para la proteína A (spa). Todas las cepas investigadas fueron positivas además para los genes hla, fnbA, ebpS y set1, y negativas para los genes sbi, sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sej, tst, eta y etb. Los genes restantes, incluyendo hlb, feb, cna (dominio A y B), cap5, cap8, agr clase I, agr clase II y sei, fueron detectados en un número variable de aislamientos. Se observaron diferencias significativas entre cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica, en el tamaño del gen clfA, en la distribución del tamaño del amplificado para el gen coa, del segmento codificador del gen Xr del gen spa y en la presencia de los genes hlb, febB, agr clase I y agr clase II, respectivamente.

Palabras clave: CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS, MASTITIS, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Recibido el 4 de marzo de 2005 y aceptado el 20 de septiembre de 2005.

*Instituto de Farmacología y Toxicología, Universidad Justus-Liebig de Giessen, Frankfurterstrasse 107, 35392 Giessen, Alemania.

**Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse, Marburgerstrasse 54, 35396 Giessen, Alemania.

***Laboratorio de Mastitis, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, km 15.5, carretera Guadalajara-Nogales, Zapopan, Jalisco, México.

Autor para correspondencia: Christoph Lämmli, Tel. 0049 641 9938406, Fax 0049 641 9938409. Correo electrónico: christoph.laemmler@vetmed.uni-giessen.de

Introduction

Staphylococcus aureus is a well known bacterial pathogen of both humans and animals. In humans this bacterium causes food poisoning, toxic shock and a variety of pyogenic infections.¹⁻⁴ In animals *S. aureus* is a major cause of mastitis in cows, sheep and goats leading to severe economic losses worldwide.⁵⁻⁷ *S. aureus* possesses various virulence factors associated with cell wall and extracellulars which contribute to the pathogenicity of single strains of this species. Most of these virulence factors have been characterized biochemically, their genes have been cloned and sequenced.^{5,8,9} The virulence factors cell wall associated include surface receptors with binding properties for immunoglobulins, fibrinogen, fibronectin, collagen and various other external proteins.¹⁰ The extracellular proteins secreted by *S. aureus* comprise, among others, a variety of staphylococcal enterotoxins, called staphylococcal enterotoxins (SE) A to Q, the exfoliative toxins A (ETA) and B (ETB), the toxic shock syndrome toxin (TSST-1) and a newly described exotoxin-like toxin group (SET 1-11).^{4,11-15} Most of these extracellular virulence factors are encoded by mobile genetic elements such as plasmids, bacteriophages or pathogenicity islands which in turn enable the horizontal spread among the *S. aureus* population.^{8,9,16} This may explain the varying occurrence and distribution of these virulence factors among *S. aureus* isolated from different origins. The information available about virulence patterns and the occurrence of some of the newly described toxins or toxin genes of *S. aureus* isolated from bovine milk samples or from food products is limited.¹⁷⁻²⁰ At present no information exists about genotypic characteristics of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Mexico. The present study was designed to genotypically investigate *S. aureus* isolated from clinical and subclinical cases of mastitic cows of one region in Mexico. These results were compared with properties of previously characterized *S. aureus* strains from Germany, Switzerland and Indonesia.^{6,7,18}

Material and methods

Bacterial isolates, identification and molecular characterization

A total of 40 *S. aureus* cultures from 40 different farms in Jalisco state in Mexico were used in this study. Among these 24 cultures were isolated from clinical mastitis cases as described previously,²¹ the remaining 16 cultures were obtained from subclinical mastitic milk samples. The *S. aureus* isolated from clinical mastitis were identified as described,²¹ and the bacte-

Introducción

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena ampliamente investigada en relación con enfermedades de animales y de humanos. En éstos causa intoxicación alimentaria, choque tóxico y una variedad de infecciones piógenas.¹⁻⁴ En animales constituye la principal causa de mastitis; en vacas, borregas y chivas es causante, en el ámbito mundial, de fuertes pérdidas económicas.⁵⁻⁷ *S. aureus* posee varios factores de virulencia asociados con la pared celular y extracelulares, los cuales contribuyen a favorecer la patogenicidad de cada cepa de esta especie. La mayoría de los factores de virulencia antes mencionados se han caracterizado bioquímicamente, sus genes han sido clonados y secuenciados.^{5,8,9} Los factores de virulencia asociados con la pared celular incluyen los receptores de superficie con propiedades enlazantes para inmunoglobulinas, fibrinógeno, fibronectina, colágeno y varias otras proteínas externas.¹⁰ Las proteínas extracelulares secretadas por el *S. aureus* comprenden, entre otras, la variedad de enterotoxinas estafilocócicas conocida como enterotoxinas estafilocócicas (SE) de la A a la Q, las toxinas exfoliativas A (ETA) y B (ETB), la toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) y una exotoxina similar nueva en el grupo (SET 1-11).^{4,11-15} La mayoría de esos factores de virulencia extracelulares están codificados por elementos móviles genéticos, como plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad, que facilitan la diseminación horizontal de las poblaciones de *S. aureus*.^{8,9,16} Esto último explica las variaciones en la presentación y distribución de los factores de virulencia entre los *S. aureus*, aislados de diferentes orígenes. La información disponible de los patrones de virulencia y la presentación de algunas de las nuevas toxinas o genes de toxinas de *S. aureus* aislados de muestras de leche bovina o de productos alimentarios es aún limitada.¹⁷⁻²⁰ Actualmente no existe información de la caracterización genotípica de *S. aureus* aislados de casos de mastitis bovina en México. Este trabajo es útil para caracterizar genotípicamente al *S. aureus* aislado de casos de vacas con mastitis clínica y subclínica de una región de México. Los resultados se compararon con propiedades de cepas de *S. aureus* previamente caracterizadas, aisladas en Alemania, Suiza e Indonesia.^{6,7,18}

Material y métodos

Aislamiento bacterianos. Identificación y caracterización molecular

Para este estudio se utilizaron 40 cultivos de *S.*

ria isolated from subclinical cases were identified by using conventional methods.⁵ The isolates were further characterized by molecular analysis amplifying the gene encoding 23S rRNA²² and the gene nuc encoding staphylococcal thermostable nuclease.²³

Isolation of genomic DNA was carried out by picking 3-5 colonies from freshly subcultured *S. aureus*. The colonies were homogenized in 50 µL TE buffer solution (10 mmol of Tris HCl/L, 1 mmol of EDTA/L, pH 8.0), followed by the addition of 1 µL lysostaphin (1.8 U/L).^{*} After an incubation for 1 h at 37°C, 1 µL proteinase K (15.1 mg/mL)^{**} was added and the suspension was reincubated for 2 h at 56°C. The proteinase K was finally inactivated through boiling of the mixture for 10 min. After centrifugation at 10 000 g for 5 min the supernatant was cooled on ice before use in PCR.

For PCR amplification, the reaction mixture (20 µL) contained 0.7 µL of primer 1 (10 pmol/µL), 0.7 µL of primer 2 (10 pmol/µL), 0.4 µL of deoxynucleoside triphosphate (10 mmol/L; MBI),^{***} 2.0 µL of 10 x thermophilic buffer,[†] 1.2 µL of MgCl₂ (25 mmol/L), 0.1 µL of Taq DNA polymerase (5 U/µL), and 12.9 µL of distilled water. Finally, 2.0 µL of DNA preparation was added to each 0.2 µL reaction tube.

The tubes were subjected to thermal cycling[‡] with the programs shown in Table 1. The presence of PCR products was determined by electrophoresis of 10 µL of the reaction product in 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.

A further investigation of the strains was performed by PCR amplification of various virulence and regulatory genes. This included the genes encoding staphylococcal clumping-factor (clfA) and coagulase (coa), the gene segments encoding the Xr-repetitive region and the immunoglobulin G binding region of staphylococcal protein A (spa), gene sbi, the alpha and beta hemolysin encoding genes (hla and hlb), the genes encoding fibronectin-binding protein A and B (fnbA and fnbB) and the elastin-binding protein (ebpS), the gene segments encoding the collagen adhesin domains A and B (cna A and B), the genes cap5, cap8, set1, agr class I and II and the genes sea to see and seg to sej, tst, eta and etb. The sequences of the oligonucleotide primers, the thermocycler programs, the amplicon sizes, and the corresponding references are summarized in Table 1. Reference cultures used as positive controls were described previously.²⁴ Statistical analysis for the genes clfA, spa (IgG binding region), hlb, fnbB, cna, cap5, cap8 and the genes agr class I and agr class II were performed with Fisher's exact test. For the genes coa and spa (Xr-region), the modified Fisher's exact test was used.

aureus de diversos establos en Jalisco, México. De esos cultivos, 24 se aislaron de casos de mastitis clínica, como se ha descrito previamente;²¹ los 16 cultivos restantes se obtuvieron de muestras de leche con mastitis subclínica. Los *S. aureus* aislados de mastitis clínica fueron identificados como ya se ha descrito,²¹ y las bacterias aisladas de casos subclínicos se identificaron usando métodos convencionales.⁵ Posteriormente esos aislamientos se caracterizaron mediante un análisis molecular, amplificando el gen codificador del 23S rARN²² y el gen nuc que codifica para la nucleasa estafilocócica termoestable.²³

El aislamiento del ADN genómico se realizó recolectando de tres a cinco colonias de un subcultivo reciente de *S. aureus*. Las colonias fueron homogenizadas en 50 µL de solución amortiguadora TE (10 mmol de Tris HCl/L, 1 mmol de EDTA/L, pH 8.0), enseguida se agregó 1 µL de lysostafina (1.8 U/µL).^{*} Después de una incubación de 1 h a 37°C, se añadió 1 µL de proteinasa K (15.1 mg/µL)^{**} y la suspensión fue reincubada durante 2 h a 56°C. La proteinasa K fue finalmente inactivada mediante la ebullición de la mezcla durante 10 min. Después de centrifugar a 10 000 g durante 5 min, el sobrenadante fue enfriado en hielo para posteriormente utilizarlo en PCR.

Para la amplificación mediante PCR, la mezcla de reacción (20 µL) contenía 0.7 µL del cebador 1 (10 pmol/µL), 0.7 µL del cebador 2 (10 pmol/µL), 0.4 µL del trifosfato desoxinucleósido (10 mmol/L; MBI),^{***} 2.0 µL del amortiguador termofílico 10 x,[†] 1.2 µL de MgCl₂ (25 mmol/µL; Promega), 0.1 µL de la Taq ADN polimerasa (5 U/µL, Promega), y 12.9 µL de agua destilada. Finalmente se agregaron 2.0 µL del ADN preparado a cada uno de los tubos de 0.2 µL.

Esos tubos fueron sometidos a ciclos térmicos[‡] con los programas mostrados en el Cuadro 1. La presencia de los productos de PCR se determinó por electroforesis de 10 µL del producto de la reacción en un gel de agarosa al 2% con 1 x amortiguador TAE (40 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA/L, 1.14 µL/L de ácido acético glacial, pH 7,8) a un voltaje de 70-100.

Enseguida se realizó otra investigación de las cepas de *S. aureus* mediante la amplificación por PCR de varios factores de virulencia y de genes regulatorios, la cual incluyó los genes codificadores del factor aglutinante –mejor conocido como clumping-factor (clfA)– y la coagulasa (coa), los segmentos del gen que codifica la región repetitiva Xr y el gen de la proteína A estafilocócica (spa), en una región que

^{*}Sigma, Deisenhofen, Germany.

^{**}Boehringer, Mannheim, Germany.

^{***}Fermentas, St. Leon-Rot, Germany.

[†]Promega, Mannheim, Germany.

[‡]Techne Progene, Wertheim, Germany or T3 thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany.

Cuadro 1

CEBADORES OLIGONUCLEÓTIDOS Y PROGRAMAS DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE VARIOS GENES DE *Staphylococcus aureus*
 OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS AND PCR PROGRAMS FOR AMPLIFICATION OF VARIOUS STAPHYLOCOCCAL GENES.

Genes	5' primer sequence (5' to 3')	3' primer sequence (5' - 3')	Prog.	Size (bp)	Reference
23S rDNA	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC	AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1	1251	22
<i>mic</i>	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	2	280	23
<i>clfA</i>	GGC TTC AGT GCT TGT AGG	TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	3	Variable	6
<i>coa</i>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	4	Variable	35
<i>spa</i> (Xt-region)	CAA GCA CCA AAA GAG GAA	CAC CAG GTT TAA CGA CAT	5	Variable	34
α (IgG binding - region)	CAC CTG CTG CAA ATG CTG CG	GGC TTG TTG TTG TCT TCC TC	4	Variable	70
<i>sbi</i>	CAC AGA GGA ACA ACG TAA CC	GAT TTA GCT AAG TAG CCG	16	956	53
<i>hla</i>	GGT TTA GCC TGG CCT TC	CAT CAC GAA CTC GTT CG	11	534	52
<i>hfb</i>	GCC AAA GCC GAA TCT AAG	CGC ATA TAC ATC CCA TGG C	12	833	52
<i>fnbA</i>	GCG GAG ATC AAA GAC AA	CCA TCT ATA GCT GTG TGG	6	1279	52
<i>fnbB</i>	GGA GAA GGA ATT AAG GCG	GCC GTC GCC TTG AGC GT	6	812	52
<i>ebpS</i>	TCA CAT CAA GAC CAT ACG GAA G	CAA CAT TTT CCG GTG AAC CTG A	16	1332	48
<i>cna</i> (A domain)	ATA TGA ATT CGA GTA TAA GGA AGG GGT T	TTT GGA TCC CTT TTT CAG TAT TAG TAA CCA	6	1600	71
<i>cna</i> (B domain)	AGT GGT TAC TAA TAC TG	CAG GAT AGT TGG TTT A	6	Variable	71
<i>cap5</i>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG	CTC GGA TAA CAC CTG TTG C	7	880	53
<i>cap8</i>	ATG ACG ATG AGG ATA GCG	CAC CTA ACA TAA GGC AAG	8	1147	53
<i>set1</i>	GGT TAA TTC ATA GCG CAG TAT C	CAA CGT TTC ATC GTT AAG CTG C	15	879	7
<i>agrI</i>	CAC TTA TCA TCA AAG AGC C	CCA CTA ATT ATA GCT GG	9	350	53
<i>agrII</i>	GTA GAG CCG TAT TGA TTC C	GTA TTT CAT CTC TTT AAG G	10	463	53
<i>sea</i>	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	13	244	72
<i>seb</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	13	477	45
<i>sec</i>	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	13	256	45
<i>sed</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	13	318	45
<i>see</i>	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	13	168	45
<i>seg</i>	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C	AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC	13	641	73
<i>seh</i>	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C	13	371	73
<i>sei</i>	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G	AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C	13	576	73
<i>sej</i>	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	14	141	74

*1: 37 times 94° C - 40 s, 64° C - 60 s, 72° C - 75 s; 2: 37 times 94° C - 60 s, 55° C - 30 s, 72° C - 30 s; 3: 35 times 94° C - 60 s, 57° C - 60 s; 4: 30 times 94° C - 60 s, 58° C - 60 s, 72° C - 60 s; 5: 30 times 94° C - 60 s, 60° C - 60 s, 72° C - 60 s; 6: 30 times 94° C - 30 s, 50° C - 30 s, 72° C - 60 s; 7: 20 times 94° C - 15 s, 57° C - 15 s, 72° C - 30 s; 8: 20 times 94° C - 15 s, 52° C - 15 s, 72° C - 30 s; 9: 20 times 94° C - 30 s, 57° C - 30 s, 72° C - 60 s; 10: 20 times 94° C - 15 s, 60° C - 15 s, 72° C - 15 s; 11: 20 times 94° C - 10 s, 53° C - 10 s, 72° C - 30 s; 12: 20 times 94° C - 10 s, 62° C - 10 s, 72° C - 30 s; 13: 30 times 94° C - 120 s, 55° C - 120 s, 72° C - 60 s; 14: 30 times 94° C - 60 s, 62° C - 60 s, 72° C - 60 s; 15: 20 times 94° C - 30 s, 56° C - 30 s, 72° C - 60 s; 17: : 30 times 94° C - 60 s, 60° C - 60 s, 72° C - 90 s.

Results

According to cultural and biochemical properties all 40 *S. aureus* isolates of the present study could be identified as *S. aureus*. The identification of the isolates could be confirmed by PCR amplification of the *S. aureus* specific genes encoding 23S rRNA, thermostable nuclease (nuc), clumping-factor (clfA) and coagulase (coa) and by amplification of the gene segments encoding the Xr repetitive region and the IgG binding region of protein A (spa). The amplicons of 23S rDNA and nuc had a uniform size of approximately 1250 bp and 280 bp, respectively.

The genes or gene segments *clfA*, *coa* and *spa* displayed size polymorphisms. The amplification of *clfA* gene revealed two different sized amplicons of 900 and 1000 bp. Among the *S. aureus* strains representing the clinical mastitic cow, 13 strains (54.2%) had an amplicon size of 900 bp, while 11 strains (45.8%) had an amplicon size of 1000 bp.

Among the *S. aureus* strains obtained from subclinical mastitis 2 (12.5%) strains had a *clfA* amplicon size of 900 bp and 14 (87.5%) strains an amplicon size of 1000 bp. The amplification of *coa* gene yielded amplicon sizes ranging from 500 bp to 840 bp. In the *S. aureus* group from clinical mastitis, the amplicons showed sizes of 500 bp for 3 (12.5%), 670 bp for 13 (54.1%), 750 bp for 3 (12.5%) and 840 bp for 5 (20.8%) isolates, respectively. The *S. aureus* obtained from subclinical mastitis had amplicon sizes of 500 bp for 1 (6.3%), 600 bp for 3 (18.8%), 670 bp for 3 (18.8%), 750 bp for 1 (6.3%) and 840 bp for 8 (50%) isolates, respectively. The amplicon sizes of *coa* gene of 500 bp, 600 bp, 670 bp, 750 bp and 840 bp corresponded to a number of 4, 5, 6, 7 and 8 repeats, respectively. By amplification of the Xr repetitive region, encoding part of protein A gene *spa* 7, different amplicon sizes could be observed with 100 bp for 3 (12.5%), 120 bp for 13 (54.2%), 150 bp for 2 (8.3%), 200 bp for 4 (16.7%) and 250 bp for 2 (8.3%) of the *S. aureus* obtained from clinical mastitis. The isolates from subclinical mastitis had amplicon sizes of 100 bp for 6 (37.5%), 180 bp for 5 (31.25%), 200 bp for 2 (12.5%), 250 bp for 2 (12.5%) and 320 bp for 1 (6.25%) isolate. The amplicon sizes of 100 bp, 120 bp, 150 bp, 180 bp, 200 bp, 250 bp and 320 bp corresponded to 2, 3, 4, 5, 6, 8, and 11 repeats of the Xr repetitive region, respectively. The amplification of the gene segment encoding the IgG binding region of *spa* yielded sizes of 700 bp in 8 (33.3%) and 2 (12.5%) of the strains and 900 bp in 16 (66.7%) and 14 (87.5%) of the strains of the clinical and subclinical *S. aureus* group, respectively. The sizes of 700 bp and 900 bp corresponded to 4 or 5 IgG binding domains, respectively.

enlaza la inmunoglobulina G, el gen *sbi*, los genes codificadores para la hemolisina alfa y beta (*hla* y *hly*), los genes que codifican las proteínas A y B que enlazan la fibronectina (*fnbA* y *fnbB*), y la proteína que enlaza la elastina (*ebpS*), los segmentos del gen que codifican la colágeno-adhesina dominios A y B (*cna* A y B), los genes *cap5*, *cap8*, *set1*, *agr* clases I y II, y los genes *sea* al *see* y *seg* al *sej*, *tst*, *eta* y *etb*. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de las secuencias de los cebadores oligonucleótidos, los programas del termociclador, los tamaños del amplificado y las referencias correspondientes. Los cultivos de referencia utilizados como testigos positivos se han descrito con anterioridad.²⁴ La prueba exacta de Fisher se utilizó para el análisis estadístico de los genes *clfA*, *spa* (IgG región de enlace), *hly*, *fnbB*, *cna*, *cap5*, *cap8* y *agr* clases I y II. La prueba exacta de Fisher modificada sirvió para realizar el análisis estadístico de los genes *coa* y *spa* (región Xr).

Resultados

Los 40 aislamientos de *S. aureus* de la presente investigación se identificaron debido a sus propiedades bioquímicas y de cultivo. La identificación de los aislamientos se confirmó mediante la amplificación con PCR de los genes específicos de *S. aureus* que codifican para 23S rARN, la nucleasa termoestable (*nuc*), el factor aglutinante (*clfA*) y la coagulasa (*coa*), y por amplificación de segmentos del gen que codifica la región repetitiva Xr y la región de enlace de IgG de la proteína A (*spa*). Los amplificados de 23S rADN y *nuc* tuvieron tamaño uniforme de casi 1 250 pb y de 280 pb, respectivamente.

Los genes o segmentos de gen *clfA*, *coa* y *spa*, mostraron polimorfismos de tamaño. La amplificación del gen *clfA* reveló dos diferentes amplificados de tamaño de 900 y 1 000 pb. Entre las cepas de *S. aureus* que representaban el grupo de las vacas con mastitis clínica, 13 cepas (54.2%) tuvieron un tamaño de amplificado de 900 pb, mientras que 11 cepas (45.8%) lo tuvieron de 1 000 pb.

De las cepas de *S. aureus* obtenidas de mastitis subclínica, dos (12.5%) tuvieron un amplificado de *clfA* con tamaño de 900 pb y 14 (87.5%) un tamaño de amplificado de 1 000 pb. Con la amplificación del gen *coa* se obtuvieron amplificados de diferente tamaño que iban de 500 pb a 840 pb. En el grupo de *S. aureus* aislados de mastitis clínica los amplificados tuvieron un tamaño de 500 pb para tres cultivos (12.5%), 670 pb para 13 (54.1%), 750 pb para tres (12.5%) y 840 pb para cinco aislamientos (20.8%), respectivamente. El *S. aureus* aislado de mastitis subclínica tuvo tamaños de amplificado de 500 pb para un aislamiento (6.3%), 600 pd para tres (18.8%), 670 pb para tres (18.8%),

The size difference of the genes *clfA*, *coa* and *spa* (Xr-region) of the clinical and subclinical *S. aureus* group appears to be significant.

Further genotypic properties of the *S. aureus* isolates revealed that certain traits such as the genes *hla*, *fnbA*, *ebpS* and *set1* with sizes of approximately 550 bp, 1280 bp, 1330 bp and 880 bp, respectively, could be observed for all 40 *S. aureus* isolates.

The gene *hlb* with a size of approximately 840 bp could be detected in all 24 *S. aureus* isolates (100%) obtained from clinical mastitis and in 13 isolates (81.3%) obtained from subclinical mastitis. Among the additionally investigated genes, gene *fnbB* with an amplicon size of approximately 820 bp could be observed for 18 (75%) and 6 (37.5%) *S. aureus* strains from the clinical and subclinical group, respectively.

Among the 40 *S. aureus* strains 6 (15%) strains (4 from clinical and 2 from subclinical group) were positive for the *cna* segments encoding the CNA A and CNA B domains. The A and B domain encoding gene segments revealed amplicons with sizes of approximately 1600 and 1200 bp, respectively. Among the additionally investigated genes, the genes *cap5* with a size of 880 bp could be observed for 20 (83.3%) and 13 (81.3%) strains, *cap8* with a size of 1150 bp for 4 (16.7%) and 3 (18.8%) strains, the gene *agr* class I with a size of 360 bp for 6 (25%) and 12 (75%) strains and the gene *agr* class II with a size of 470 bp for 16 (66.6%) and 4 (25%) strains of the clinical and subclinical *S. aureus* group, respectively. The distribution of the genes *hla*, *fnbB*, *agr* class I and *agr* class II among the clinical and subclinical *S. aureus* strains appears to be significant. Two (8.3%) *S. aureus* strains could not be characterized by the use of the oligonucleotide primers specific for *agr* class I and II.

Investigating the *S. aureus* for other virulence genes yielded one strain (4.2%) positive for gene *sei* with a size of 580 bp. None of the strains harboured the genes encoding *sbi*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sej*, *tst*, *eta* and *etb*. The genotypic characteristics of the 40 *S. aureus* strains are summarized in Table 2 and 3. Typical amplicons of the genes *clfA* and *spa* (Xr-region) are shown in Figure 1.

Discussion

S. aureus is a well known bacterial pathogen in human and animal infections. A phenotypic and genotypic characterization of *S. aureus* strains from bovine mastitis has been performed for isolates from various countries.^{6,7,17,18,25-30} However, at present no information is available about genotypic characteristics of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Mexico.

In the present study 40 *S. aureus* strains isolated from clinical and subclinical mastitic cows in Jalisco

750 pb para uno (6.3%) y 840 pb para ocho (50%), respectivamente. Los tamaños de amplificado del gen *coa* de 500 pb, 600 pb, 670 pb, 750 pb y 840 pb corresponden a un número de repetición de 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente. En la amplificación de la región repetitiva Xr que codifica para una parte de la proteína A, del gen *spa* 7, se observaron tamaños de amplificados diferentes con 100 pb para tres (12.5%), 120 pb para 13 (54.2%), 150 pb para dos (8.3%), 200 pb para cuatro (16.7%) y 250 pb para dos (8.3%) de los *S. aureus* aislados de mastitis clínica. Los aislamientos de mastitis subclínica tuvieron tamaños de amplificado 100 pb para seis cultivos (37.5%), 180 pb para cinco (31.25%), 200 pb para dos (12.5%), 250 pb para dos (12.5%) y 320 pb para un cultivo (6.25%). Los tamaños de amplificados de 100 pb, 120 pb, 150 pb, 180 pb, 200 pb, 250 pb y 320 pb correspondieron a 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 11 repeticiones de la región repetitiva Xr, respectivamente. La amplificación del segmento del gen que codifica para la región de enlace de IgG del *spa* tuvo tamaños de 700 pb en ocho (33.3%) y dos cepas (12.5%) y 900 pb en 16 (66.7%) y 14 (87.5%) de las cepas de los grupos clínico y subclínico de *S. aureus*, respectivamente. Los tamaños de 700 pb y 900 pb correspondieron a los dominios cuatro o cinco del enlace IgG, respectivamente.

La diferencia de tamaño de los genes *clfA*, *coa* y *spa* (región Xr) de los grupos clínico y subclínico de *S. aureus* parece ser significativa.

Respecto de otras propiedades genotípicas de los aislamientos de *S. aureus*, se revelaron ciertas características: los genes *hla*, *fnbA*, *ebpS* y *set1* con tamaños de aproximadamente 550 pb, 1 280 pb, 1 330 pb y 880 pb, respectivamente, pudieron observarse en los 40 aislamientos de *S. aureus*.

El gen *hla* al tamaño de casi 840 pb se detectó en los 24 aislamientos de *S. aureus* (100%) obtenidos de mastitis clínica y en 13 aislamientos (81.3%) obtenidos de mastitis subclínica. De los genes investigados adicionalmente, el gen *fnbB* con un amplificado al tamaño de casi 820 pb pudo observarse en 18 (75%) y seis (37.5%) cepas de *S. aureus* aisladas de los grupos clínico y subclínico, respectivamente.

Entre las 40 cepas de *S. aureus*, seis (15%) aislamientos (cuatro del grupo clínico y dos del subclínico) fueron positivos para los segmentos *cna* que codifican para los dominios CNA A y CNA B. Los dominios A y B que codifican para segmentos de genes tuvieron amplificados con tamaños de casi 1 600 y 1 200 pb, en forma respectiva. Acerca de los genes investigados adicionalmente, los genes *cap5* al tamaño de 880 pb se observaron en 20 (83.3%) y 13 (81.3%) cepas; para el *cap8* al tamaño de 1 150 pb en cuatro (16.7%) y tres (18.8%) cepas; el gen *agr* clase I al tamaño de 360 pb en seis (25%) y 12 (75%) cepas, y

Cuadro 2

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DE 24 Y 16 AISLAMIENTOS DE *S. aureus* PROVENIENTES DE VACAS CON MASTITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA, RESPECTIVAMENTE
 GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF 24 AND 16 *S. aureus* ISOLATED FROM CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIC COWS, RESPECTIVELY.

Target gene	<i>S. aureus</i> from clinical mastitis (n = 24)		<i>S. aureus</i> from subclinical mastitis (n = 16)	
	n	%	n	%
23S rDNA	24	100	16	100
<i>nuc</i>	24	100	16	100
<i>clfA</i> *	24	100	16	100
<i>coa</i> *	24	100	16	100
<i>spa</i> (Xr-reg.)*	24	100	16	100
<i>spa</i> (IgG bind. reg.)*	24	100	16	100
<i>hla</i>	24	100	16	100
<i>hlb</i>	24	100**	13	81.3**
<i>fnbA</i>	24	100	16	100
<i>fnbB</i>	18	75**	6	37.5**
<i>ebpS</i>	24	100	16	100
<i>cna</i> (A domain)	4	16.7	2	12.5
<i>cna</i> (B domain)	4	16.7	2	12.5
<i>cap5</i>	20	83.3	13	81.3
<i>cap8</i>	4	16.7	3	18.8
<i>set1</i>	24	100	16	100
<i>agr</i> class I	6	25**	12	75**
<i>agr</i> class II	16	66.6**	4	25**
<i>sei</i>	0	0	1	4.2

n = number of cultures

* = for gene polymorphisms see Table 3

** = statistically significant with P values of 0.056, 0.024 and 0.007 for the genes *hla*, *fnbB* and *agr*, respectively;

None of the cultures were positive for *sbi*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sej*, *tst*, *eta* and *etb*.

State, Mexico were genotypically investigated and compared. This state produces approximately 3.8 million liters of milk daily and has the biggest dairy herds in Mexico. Udder infections of dairy animals in this state cause an enormous economic loss.

According to phenotypic and genotypic properties all 40 isolates of the present study could be identified as *S. aureus*. A molecular identification was performed by PCR amplification of various genes, namely the gene segments encoding a *S. aureus* specific part of 23S rRNA, the genes encoding thermostable nuclease (*nuc*), clumping-factor (*clfA*), coagulase (*coa*) and the

el gen *agr* clase II al tamaño de 470 pb en 16 (66.6%) y cuatro (25%) cepas de los grupos clínico y subclínico de *S. aureus*, respectivamente. La distribución de los genes *hla*, *fnbB*, *agr* clase I y *agr* clase II entre las cepas clínica y subclínica de *S. aureus* parece ser significativa. Dos cepas de *S. aureus* (8.3%) no pudieron ser caracterizadas mediante el uso de los cebadores oligonucleótidos específicos de *agr* clase I y II.

La investigación de *S. aureus* para otros genes de virulencia dio una cepa positiva (4.2%) para el gen *sei*, con un tamaño de 580 pb. Ninguna de las cepas

Cuadro 3

TAMAÑO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *clfA*, *coa* Y *spa* DETERMINADOS EN 24 Y 16 AISLAMIENTOS DE *S. aureus* DE MASTITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA, RESPECTIVAMENTE
 SIZE POLYMORPHISMS OF THE TARGET GENES *clfA*, *coa* AND *spa* DETERMINED FOR 24 AND 16 *S. aureus* ISOLATED FROM CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS, RESPECTIVELY

Target gene	Amplicon size (bp)	<i>S. aureus</i> from clinical mastitis (n = 24)		<i>S. aureus</i> from subclinical mastitis (n = 16)	
		n	%	n	%
<i>clfA</i> *	900	13	54.2	2	12.5
	1000	11	45.8	14	87.5
<i>coa</i> *	500	3	12.5	1	6.3
	600	0	0	3	18.8
	670	13	54.1	3	18.8
	750	3	12.5	1	6.3
	840	5	20.8	8	50
<i>spa</i> (Xr-reg.)*	100	3	12.5	6	37.5
	120	13	54.2	0	0
	150	2	8.3	5	51.25
	180	0	0	0	0
	200	4	16.7	2	12.5
	250	2	8.3	2	12.5
	320	0	0	1	6.25
<i>spa</i> (IgG bind. reg.)**	700	8	33.3	2	12.5
	900	16	66.7	14	87.5

n = number of strains

* = statistically significant with P values = 0.009, 0.002 and 0.0008 for the genes *clfA*, *coa* and *spa* (Xr-region), respectively.

** = statistically non significant with P value = 0.2

spa gene segments encoding the Xr-repetitive region and the IgG binding region of Protein A. A comparable PCR-based identification and characterization of *S. aureus* from bovine origin had already been used by numerous authors.^{6,7,18,31,32} According to the results of the present study, the genes *clfA*, *coa* and *spa* showed typical gene polymorphisms which could be used for genotypic characterization of single isolates of this species. Comparable gene polymorphisms had already been used for genotyping various *S. aureus* strains.³³⁻³⁵

The specific binding of *S. aureus* to fibrinogen is mainly mediated by clumping factor A (ClfA), encoded by *clfA*. Inactivation of ClfA results in an inhibition of the attachment of *S. aureus* to fibrinogen-coated surfaces.^{36,37} In agreement with the work of other authors,^{6,7,18} all bovine isolates investigated

poseía genes que codifican *sbi*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sej*, *tst*, *eta* y *etb*. Las características genotípicas de las 40 cepas de *S. aureus* se resumen en los cuadros 2 y 3. Los amplificadores típicos de los genes *clfA* y *spa* (región Xr) se muestran en la Figura 1.

Discusión

El *S. aureus* es un patógeno bacteriano bien estudiado en infecciones de humanos y animales. La caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina se ha realizado en varios países.^{6,7,17,18,25-30} Sin embargo, actualmente no se dispone de información sobre las características genotípicas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en México.

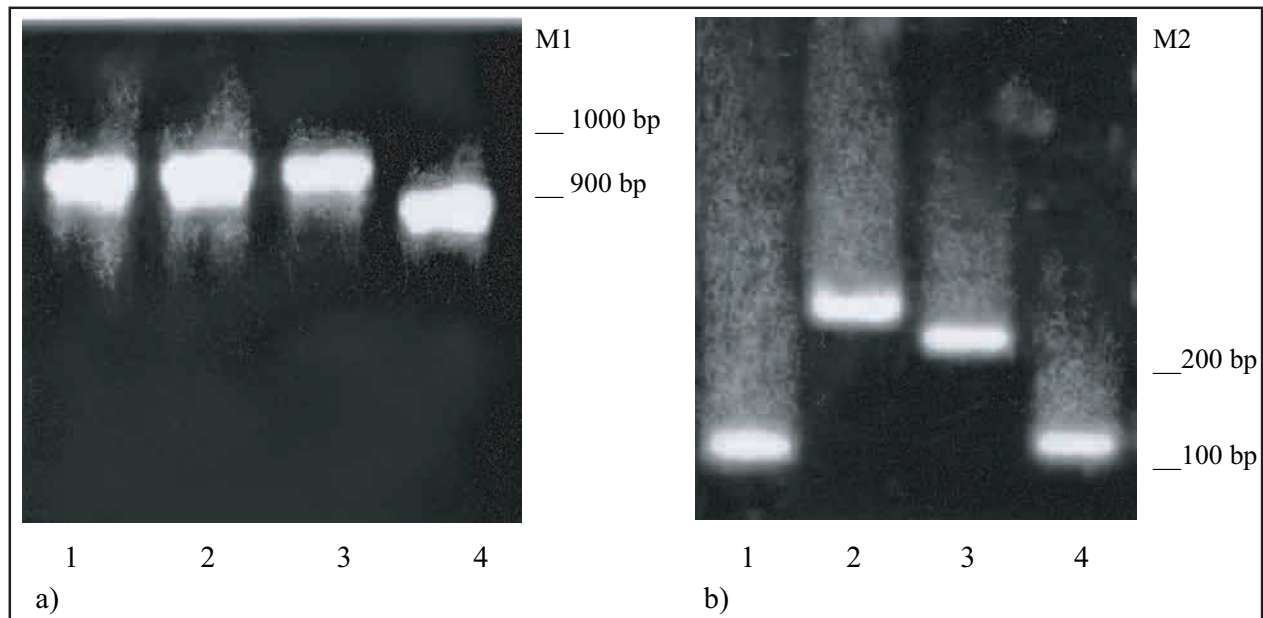


Figura 1. a) Amplificados típicos del gen *clfA* que codifica ClfA de cuatro cepas de *S. aureus* con tamaños de 900 pb4 y 1 000 pb,1-3 aproximadamente. b) Amplificados del segmento de gen que codifica la región Xr de la proteína A, el gen *spa* de cuatro cepas de *S. aureus* con tamaños de 100 pb1, 4 200 pb2 y 180 pb 3 M1: marcador de peso molecular del ADN VI (Roche); M2: 100 pb marcador, Gibco BRL.

Figure 1. a) Typical amplicons of the gene *clfA* encoding ClfA of 4 *S. aureus* strains with sizes of approximately 900 bp (4) and 1000 bp (1, 2 and 3). b) Amplicons of the gene segment encoding the Xr-region of protein A gene *spa* of 4 *S. aureus* strains with sizes of 100 bp (1,4), 200 bp (2) and 180 bp (3). M1: DNA molecular weight marker VI (Roche), M2: 100 bp marker, Gibco BRL.

in the present study were *clfA* positive. A comparison between the source of the investigated strains and the *clfA* amplicon size revealed that a size of 900 bp could generally be found among the *S. aureus* strains isolated from clinical mastitis cases, a *clfA* amplicon size of 1000 bp could mainly be found among the *S. aureus* isolated from subclinical mastitis. Comparable statistically significant differences between the two *S. aureus* groups could also be observed in the amplicon size of gene *coa* and the *spa* gene segment encoding the Xr-region of protein A. However, at present the importance of the size of the polymorphisms of the genes *clfA*, *coa* or *spa* (Xr-region) for the mastitis situation of the respective animals remains unclear.

Sbi is an IgG and β 2 glycoprotein binding protein on the surface of *S. aureus* encoded by gene *sbi*. According to Zhang *et al.*,³⁸ this gene could be found in *S. aureus* reference strains investigated by these authors. However, all strains of the present study were *sbi* negative. This could possibly be explained by a lack of this gene or by mutation of the primer binding site causing a negative PCR reaction.

The 40 investigated *S. aureus* strains of the present investigation were additionally positive for the alpha hemolysin encoding gene *hla*, 24 isolates obtained from clinical mastitis and 13 isolates obtained from

En el presente estudio, 40 cepas de *S. aureus*, aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica de Jalisco, México, fueron estudiadas genotípicamente y comparadas. Este estado produce aproximadamente 3.8 millones de litros de leche cada día y tiene la mayor población de vacas lecheras en México. Las infecciones de las ubres de las vacas lecheras ahí causan graves pérdidas económicas.

Las propiedades fenotípicas y genotípicas de los 40 aislamientos del presente estudio correspondieron a *S. aureus*. Se realizó identificación molecular mediante la amplificación de varios genes por PCR, que fueron el segmento de gen que codifica para una parte específica del 23S rARN de *S. aureus*, los genes que codifican para la nucleasa termoestable (*nuc*), el factor aglutinante o *clumping-factor* (*clfA*), la coagulasa (*coa*) y el gen *spa* en el segmento que codifica la región repetitiva Xr y la región de enlace de la IgG para la proteína A. Una identificación similar basada en el PCR con caracterización de *S. aureus* de origen bovino ha sido ya realizada por numerosos autores.^{6,7,18,31,32} De acuerdo con los resultados del presente estudio, los genes *clfA*, *coa* y *spa* mostraron típicos polimorfismos genéticos, que podrían ser utilizados para una caracterización genotípica de cada aislamiento de esta especie. Ya se han utilizado polimorfismos genéticos

subclinical mastitis were positive for the beta hemolysin encoding gene *hlyB*. The presence of alpha and beta hemolysin seems to be a typical pattern of *S. aureus* isolated from bovine mastitis. It is suggested that such a haemolysin profile is required for the induction of mastitis in cattle.^{39,40} The absence of gene *hlyB* for some *S. aureus* strains isolated from subclinical cases might affect their ability to induce clinical mastitis due to the role this gene product has in tissue penetration and multiplication and disease induction.^{12,40-42}

The capability of *S. aureus* to adhere to extracellular matrix proteins is thought to be essential for colonization and the establishment of infections. *S. aureus* possesses variable adhesion genes such as *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *cna*, *fib*, *fbpA*, and *map*.⁴³ The presence of *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS* and *cna*, was investigated in the present work.

The fibronectin-binding proteins of *S. aureus* are important virulence factors and contribute to bacterial adhesion and to invasion of the bovine mammary gland.⁴⁴ For *S. aureus* two fibronectin binding proteins (FnBA, B) had been described and their corresponding genes have a high degree of sequence similarity.⁴⁵ In the present study, *fnbA* and *fnbB* were detected in 100% and 60% of the investigated isolates, respectively. The presence of *fnbB* varied between the two *S. aureus* groups, being 75% for the clinical isolates and 37.5% for the strains isolated from subclinical cases. According to Greene *et al.*⁴⁶ the absence of gene *fnbB* does not affect the capability of adherence of *S. aureus*. However, the absence of this gene may affect their ability to invade the host cells.⁴¹ The combined occurrence of *fnbA* and *fnbB* among the clinical *S. aureus* group of the present study might be important for the specific adhesion of this bacterium in clinical mastitis cases.

The additionally investigated gene *ebpS* encoding elastin-binding protein (EbpS) could be determined for all *S. aureus* strains of the present study. Elastin and elastic fibres are present in abundance in mammalian tissues that require elasticity playing a crucial role in maintaining the structural integrity and function of tissues in which reversible extensibility or deformability is required.⁴⁷ *S. aureus* binds to soluble tropoelastin via the cell-surface-associated 25-kDa protein EbpS.⁴⁸ This interaction may promote bacterial colonization⁴⁹ and might also play a role for the adhesion and colonization of *S. aureus* isolated from bovine mastitis.

The gene *cna* is the only recognized *S. aureus* gene that encodes an adhesin that specifically binds collagen.⁵⁰ In addition, this adhesin protein gene is not present in all *S. aureus* strains and might; therefore, be of importance for the virulence of single strains of this species.^{51,53} However, gene *cna* was found in 15% of

comparables para la genotipificación de diferentes cepas de *S. aureus*.³³⁻³⁵

El enlace específico de *S. aureus* al fibrinógeno está principalmente mediado por el factor aglutinante A (ClfA), codificado por *clfA*. La inactivación del ClfA resulta en la inhibición del enlace de *S. aureus* a superficies cubiertas de fibrinógeno.^{36,37} De acuerdo con trabajos de otros autores,^{6,7,18} en el presente estudio todos los aislamientos de bovinos investigados resultaron positivos para *clfA*. Una comparación entre la fuente de las cepas investigadas y el tamaño del amplificado de *clfA* reveló que un tamaño de 900 pb generalmente puede encontrarse entre las cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis clínica, y el tamaño de amplificado para *clfA* de 1 000 pb puede encontrarse principalmente en el *S. aureus* aislado de mastitis subclínica. Diferencias similares estadísticamente significativas, entre dos grupos diferentes de *S. aureus*, también se han observado en el tamaño de amplificado del gen *coa* y del gen *spa* en el segmento codificador de la región Xr de la proteína A. Sin embargo, actualmente aún no está clara la importancia de los tamaños de los polimorfismos de los genes *clfA*, *coa* o *spa* (región Xr) respecto de la situación de la mastitis en los respectivos animales.

La Sbi es una glicoproteína que enlaza una IgG y β_2 en la superficie del *S. aureus* codificada por el gen *sbi*. De acuerdo con Zhang *et al.*,³⁸ este gen se encontró en las cepas de referencia de *S. aureus* investigadas por esos autores. Sin embargo, todas las cepas del presente estudio fueron negativas para *sbi*. Esto último puede ser explicado debido a una ausencia de este gen o por una mutación del sitio de enlace del cebador, causando una reacción negativa de PCR.

Las 40 cepas de *S. aureus* de la presente investigación fueron, además, positivas para el gen *hlyA*, que codifica la hemolisina alfa;²⁴ aislamientos obtenidos de mastitis clínica y 13 aislamientos obtenidos de mastitis subclínica resultaron positivos para la beta hemolisina codificada por el gen *hlyB*. La presencia de las hemolisinas alfa y beta parece tener un patrón típico en el *S. aureus* aislado de mastitis bovina. Esto último sugiere que tal perfil de la hemolisina es necesario para la inducción de la mastitis en las vacas.^{39,40} La ausencia del gen *hlyB* en algunas cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis subclínica puede afectar su capacidad para inducir la mastitis clínica, debido al papel que juega este gen en la penetración del tejido, la multiplicación y la inducción de la enfermedad.^{12,40-42}

Se cree que la capacidad que tiene *S. aureus* para adherirse a matrices extracelulares de proteínas es esencial para la colonización y el establecimiento de las infecciones. El *S. aureus* posee varios genes de adhesión, como *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *cna*, *fib*, *fbpA*

the investigated *S. aureus* strains of the present study, indicating a minor importance of this adhesin for *S. aureus* bovine mastitis infection. A strong association between the presence of CNA and cap8 was reported by Booth *et al.*,⁵² and Ryding *et al.*⁵⁴ A comparable relation could be demonstrated for the *cna* positive strains of the present study. *cap8* is one of 11 polysaccharide capsule types which could be produced by *S. aureus*.⁵⁵ The capsular polysaccharide is participated in the masking of the bacterial target of most of the naturally acquired opsonins present in normal bovine serum resulting in an increased resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes.⁵⁶

Most strains from bovine milk could be classified to capsular type 5 and 8.^{57,58} The genes involved in serotype 5 and 8, *cap5* and *cap8* are chromosomal and allelic.⁵⁹ The occurrence of *cap5* or *cap8* varies in isolates from different geographical regions.^{7,55} Most of the strains (82.5%) of the present study were *cap5*, the remaining strains (17.5%) were *cap8* positive. These results are in agreement with Hensen *et al.*⁶⁰ Both capsular types could be observed in the present investigation in clinical and subclinical mastitis isolates without statistical significance.

agr, *sar* and *sae* are global loci and regulate the production of virulence factors.⁶¹ The genes involved in serotype 5 and 8 capsule biosynthesis *cap5* and *cap8* are positively regulated by the accessory gene regulator (*agr*).^{62,63}

Investigating the *S. aureus* of the present study for *agr* I and *agr* II encoding genes revealed that the strains isolated from clinical mastitis were generally positive for *agr* II, while the strains from subclinical mastitis were mainly positive for *agr* I. However, the relationship of these differences in gene regulation to the respective mastitis situation remains unclear.

The presence of gene *set1* in all investigated strains of the present investigation suggests an important role of this newly described toxin group^{64,65} also in bovine mastitis.

Enterotoxins produced by *S. aureus* are 23 to 29 kD single chain proteins with potent immunomodulating properties. They are mostly carried on mobile genetic elements which enable them to a horizontal transfer among the bacterial population.^{16,65} The presence of enterotoxin and TSST encoding genes among *S. aureus* isolated from mastitic milk varies,^{6,7,17,18,25,26,28,30,66} being very high in Japan²⁷ and rare in Denmark.²⁹ Among bovine *S. aureus* isolated in Germany and Switzerland the enterotoxin genes *seg* and *sei* predominated.^{6,7,18} In the present study, two strains harboured the gene *sei* while the genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sej* and *tst* could not be detected. The genes *seg* and *sei* are carried on the same pathogenicity island and are; therefore, mostly

and *map*.⁴³ En la presente investigación se estudió la presencia de *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS* y *cna*,

Las proteínas que enlazan la fibronectina de *S. aureus* son un factor de virulencia muy importante, contribuyen a la adhesión bacteriana y a la invasión de la glándula mamaria bovina.⁴⁴ En relación con el *S. aureus*, se han descrito dos proteínas enlazantes de la fibronectina (*FnbA*, *B*), y sus genes correspondientes tienen un alto grado de similitud en su secuencia.⁴⁵ En este trabajo se detectaron *fnbA* y *fnbB* en 100% y 60% de los aislamientos investigados, respectivamente. La presencia de *fnbB* varió entre los dos grupos de *S. aureus*, alcanzando 75% para los aislamientos clínicos y 37.5% para las cepas aisladas de casos subclínicos. De acuerdo con Greene *et al.*,⁴⁶ la ausencia del gen *fnbB* no afecta la capacidad de adherencia del *S. aureus*. Sin embargo, la ausencia de este gen puede afectar su habilidad para invadir las células portadoras.⁴¹ La presentación combinada de *fnbA* y *fnbB* en el grupo clínico de *S. aureus* detectada aquí, puede ser importante para la adhesión específica de esta bacteria en los casos de mastitis clínica.

Los genes investigados adicionalmente *ebpS* que codifican la proteína que enlaza elastina (*EbpS*) se observaron en todas las cepas de *S. aureus*. La elastina y las fibras elásticas están presentes en abundancia en tejidos de mamíferos en los que la elasticidad es muy importante para mantener la integridad estructural y la función de tejidos en los cuales la deformación o la extensibilidad reversible es necesaria.⁴⁷ El *S. aureus* enlaza la tropoelastina soluble, vía la proteína *EbpS* de 25-kDa, asociada con la superficie celular.⁴⁸ Esta interacción puede promover la colonización bacteriana⁴⁹ y también es importante para la adhesión y colonización de *S. aureus* en cepas aisladas de mastitis bovina.

El gen *cna* es el único reconocido de *S. aureus* que codifica para una adhesina que específicamente enlaza al colágeno.⁵⁰ Además, este gen de la proteína adhesina no está presente en todas las cepas de *S. aureus*, por ello es importante para la virulencia de cepas sencillas de esta especie.⁵¹⁻⁵³ Sin embargo, el gen *cna* se encontró en 15% de las cepas de *S. aureus* investigadas en el presente estudio, lo cual indica una importancia mínima de esta adhesina en las infecciones de mastitis bovinas causadas por *S. aureus*. Booth *et al.*⁵² y Ryding *et al.*⁵⁴ describieron una fuerte asociación entre la presencia de CNA y *cap8*, y en el presente estudio se demostró una relación parecida para las cepas *cna* positivas. La *cap8* es uno de los 11 tipos de polisacáridos capsulares que pueden ser producidos por *S. aureus*.⁵⁵ El polisacárido capsular participa enmascarando la bacteria extraña de la mayoría de las opsoninas naturales presentes en un suero bovino normal, lo cual resulta en el incremento

detected together.⁶⁷ However, the presence of sei for a seg negative strain was also reported by Akineden *et al.*¹⁸ and might be caused by a lack of the gene or by a mutation of the DNA at the primer binding sites. This may also explain the lack of seg of the sei positive strains of the present investigation. Enterotoxins are mostly incriminated in food intoxication in humans. Their role in bovine mastitis remains questionable.⁴⁰ However, based on the rare occurrence of enterotoxin genes among the 40 *S. aureus* strains of the present study, the presence of these toxins seems to be not of importance to establish mastitis infection.

ETA is one of the major *S. aureus* virulence factors incriminated in staphylococcal scalded skin syndrome in children.⁶⁸ The eta encoding gene is carried on a bacteriophage and is rarely detected among bovine isolates.⁶⁹ At present etb could not be found in *S. aureus* from bovine origin.²⁶ In agreement with the published data, the genes eta and etb could not be detected in any of the tested strains of the present work.

The genotyping results of the present study give a first information about genotypic properties and the distribution of virulence genes among the *S. aureus* population in Jalisco, Mexico. This might help to understand the mastitis situation in bovines in Mexico and could be the base for preventive strategies by eradicating *S. aureus* strains with enhanced pathogenic potential. The differences in gene patterns of the *S. aureus* isolates from clinical and subclinical mastitis of the present study and the importance of these differences for the respective mastitis situation, has to be investigated with a larger number of strains.

Acknowledgment

The statistical analysis were kindly performed by Dr. K. Failing, Arbeitsgruppe Biomathematik, Justus-Liebig Universität, Gießen.

Referencias

1. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 1-17
2. McCormick J K, Yarwood JM, Schlievert PM: Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 77-104.
3. Weems JJ Jr. The many phases of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgrad Med* 2001; 110: 24-26, 29-31, 35-36.
4. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 31: 63-76.
5. Brückler J, Schwarz S, Untermann F. Staphylokokken-Infektionen und-Enterotoxine, Band. II/1. In: Blobel H,

de la resistencia a la fagocitosis y a los leucocitos polimorfonucleares.⁵⁶

La mayoría de las cepas aisladas de leche bovina pueden clasificarse en los tipos capsulares 5 y 8.^{57,58} Los genes involucrados en la biosíntesis capsular de los serotipos 5 y 8, cap5 y cap8, son cromosomales y alélicos.⁵⁹ La presencia de cap5 o cap8 varía en aislamientos según las diferentes regiones geográficas.^{7,55} La mayoría de las cepas del presente estudio (82.5%) fueron cap5; las cepas restantes (17.5%) fueron positivas a cap8. Estos resultados concuerdan con los de Hensen *et al.*⁶⁰ Ambos tipos capsulares fueron observados en la presente investigación en los aislamientos de mastitis clínica y subclínica sin ser estadísticamente significativos.

Agr, sar y sae son loci globales y regulan la producción de los factores de virulencia.⁶¹ Los genes involucrados en la biosíntesis capsular de los serotipos 5 y 8, cap5 y cap8, están regulados positivamente por el gen accesorio regulador (agr).^{62,63}

La investigación presente de *S. aureus* para los genes que codifican la agr I y agr II mostraron que las cepas aisladas de mastitis clínica fueron positivas en general para agr II, mientras que las cepas de mastitis subclínica fueron principalmente positivas para agr I. Sin embargo, aún no está clara la relación de esas diferencias en la regulación genética para la situación respectiva de la mastitis.

La presencia del gen set1 en todas las cepas investigadas en este trabajo sugieren que esta nueva toxina de grupo, recientemente descrita, también es relevante en la mastitis bovina.^{64,65}

Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* son proteínas de cadena única de 23 a 29 kD con propiedades inmunomoduladoras potentes. Se encuentran situadas en su mayoría en elementos genéticos móviles que los capacitan para una transferencia horizontal entre las poblaciones bacterianas.^{16,65} La presencia de genes que codifican para enterotoxinas y TSST en los aislamientos de *S. aureus* de leche con mastitis varía,^{6,7,17,18,25,26,28,30,66} es muy alta en Japón²⁷ y rara en Dinamarca.²⁹ De los aislamientos bovinos de *S. aureus* en Alemania y Suiza predominaron los genes de seg y sei.^{6,7,18} En el presente estudio dos cepas eran portadoras del gen sei mientras que los genes sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sej y tst no se pudieron detectar. Los genes seg y sei se encuentran en la misma isla de patogenicidad y son detectados normalmente juntos.⁶⁷ Sin embargo, la presencia de una cepa sei positiva con seg negativa, también ha sido notificada por Akineden *et al.*¹⁸ y puede ser causada por una ausencia del gen o por la mutación del ADN en los sitios de enlace del cebador. Esto último también puede explicar la ausencia del seg con la presencia de cepas positivas

Schließer Th, editor. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart. 1994.

6. Stephan R, Annemüller C, Hassan AA, Lämmler C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet Microbiol* 2001; 78: 373-382.
7. Salasia SIO, Khusnan Z, Lämmler C, Zschöck M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine subclinical mastitis in Central Java, Indonesia and Hesse, Germany. *J Vet Sci* 2004 (in press).
8. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357: 1225-1240.
9. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 2002; 359: 1819-1827.
10. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 174-229.
11. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 2000; 61, 1-10.
12. Dinges, MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 16-34.
13. Orwin PM, Leung DY, Tripp TJ, Bohach GA, Earhart CA, Ohlendorf DH, et al. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* 2002; 41: 14033-14040.
14. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. *J Biol Chem* 2002; 277: 13138-13147.
15. Fitzgerald J, Reid DS, Ruotsalainen E, Tripp TJ, Liu MY, Cole R, et al. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins. *Infect Immun* 2003; 71: 2827-2838.
16. Novick RP: Mobile genetic elements and bacterial toxins. The superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 2003; 49: 93-105.
17. Zschöck M, Sommerhäuser J, Castañeda H. Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd. *J Dairy Res* 2000; 67: 429-435.
18. Akineden O, Annemüller C, Hassan AA, Lämmler C, 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.
19. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the

para sei en la presente investigación. Las enterotoxinas se encuentran principalmente relacionadas con intoxicación alimentaria en humanos. Su papel en la mastitis bovina continúa siendo muy dudosa.⁴⁰ Sin embargo, basados en la rara presentación de los genes de enterotoxinas entre las 40 cepas de *S. aureus* del presente estudio, parece ser que la presencia de esas toxinas no es importante para la iniciación de una infección de mastitis.

La ETA es uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus* relacionado con el síndrome estafilocócico de piel escaldada en niños.⁶⁸ El gen eta se encuentra en un bacteriófago y raramente se le detecta en aislamientos bovinos.⁶⁹ Actualmente el etb no se ha podido encontrar en *S. aureus* de origen bovino.²⁶ De acuerdo con las publicaciones anteriores, los genes eta y etb no pudieron ser detectados en ninguna de las cepas involucradas en la presente investigación.

Los resultados de la genotipificación del presente estudio dan una primera información acerca de las propiedades genotípicas y de la distribución de los genes de virulencia entre la población de *S. aureus* en Jalisco, México. Lo anterior ayuda al entendimiento de la situación de la mastitis bovina en este país y puede ser la base de estrategias preventivas para erradicar cepas de *S. aureus* con fuerte potencial patógeno. Las diferencias en los patrones génicos de los aislamientos de *S. aureus* de mastitis clínica y subclínica en el presente estudio, así como la importancia de esas diferencias para la situación respectiva de la mastitis deberán ser investigadas con un número mayor de cepas.

Agradecimientos

El análisis estadístico fue realizado por K. Failing, Grupo de trabajo de Biomatemáticas, Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania.

enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 857-562.

20. Rosec JP, Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol* 2002; 77: 61-70.
21. Wolter W, Castañeda VH, Jung HP, Zschöck M. Occurrence and prevalence of bacterial pathogens in bovine mastitis in Jalisco, Mexico. XXII World Buiatrics Congress; 2002 August 18-23 Hannover, Germany. Hannover, Germany: World Association for Buiatrics, 2002:126-127.
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 OD, 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. Nashev D, Toshkova K, Salasia SIO, Hassan AA, Lämmler C, Zschöck M. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. FEMS Microbiol Lett 2004; 233: 45-52.
25. Puig de Centorbi ON, M. de Cuadrado A, Alcaraz LE, Laciari AL, C de Milan M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in dairies of the city of San Luis. Rev Argent Microbiol 1992; 24: 73-80.
26. Hayakawa Y, Hayashi M, Shimano T, Komae H, Takeuchi K, Endou M, et al. Production of exfoliative toxin A by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. J Vet Med Sci 1998; 60: 1281-1283.
27. Takeuchi S, Ishiguro K, Ikegami M, Kaidoh T, Hayakawa Y. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. Vet Microbiol 1998; 59: 251-258.
28. Cardoso HF, Silva N, Sena MJ, Carmo LS. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. Lett Appl Microbiol 1999; 29: 347-349.
29. Larsen HD, Huda A, Eriksen NH, Jensen NE. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. Vet Microbiol 2000; 76 153-162.
30. Nagase N, Shimizu A, Kawano J, Ymashita K, Yoshimura H, Ishimaru M, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. J Vet Med Sci 2002; 64: 1169-1172.
31. Annemüller C, Lämmler C, Zschöck M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet Microbiol 1999; 69: 217-224.
32. Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. Vet Microbiol 1999; 67: 127-141.
33. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1992; 30: 1642-1645.
34. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, 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.
35. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene. J Clin Microbiol 1998; 36: 1083-1089.
36. Que Y.A., Francois P, Haefliger JA, Entenza JM, Vaudaux P, Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. Infect Immun 2001; 69: 6296-6302.
37. Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus in vitro* and during device-related infection. Infect Immun 2002; 70: 2758-2762.
38. Zhang L, Jacobsson K, Vasi J, Lindberg M, Frykberg L. A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*. Microbiology 1998; 144: 985-991.
39. Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. APMIS 1999; 107: 425-430.
40. Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. Vet Microbiol 2002; 85: 61-67.
41. Salmenlinna S. Academic dissertation, Helsinki Finlandia: University of Helsinki, 2002.
42. Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, Chen Y. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and beta-toxin. J Biol Chem 2004; 279: 251-258.
43. Smeltzer MS, Gillaspay AF, Pratt Jr FL, Thames MD, Iandolo JJ. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. Gene 1997; 196: 249-259.
44. Lammers A, Nuijten PJM, Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. FEMS Microbiol Lett 1999; 180: 103-109.
45. Jonsson K, Signas C, Müller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*: the complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. Eur J Biochem 1991; 202: 1041-1048.
46. Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. Mol Microbiol 1995; 17: 1143-1152.
47. Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. N Engl J Med 1981; 304: 566-579.
48. Park PW, Rosenbloom J, Abrams WR, Rosenbloom J, Mecham RP. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (EbpS) in *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 1996; 271: 15803-15809.
49. Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. J Biol Chem 2002; 277: 243-250.
50. Patti JM, Jonsson K, Guss B, Switalski LM, Wigberg K, Lindberg M, et al. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin (MSCRAMM). J Biol Chem 2002; 270: 12005-12011.
51. Gillaspay AF, Patti JM, Pratt FL, Iandolo JJ, Smeltzer

- MS. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin-encoding gene (*cna*) is within a discrete genetic element. *Gene* 1997; 196: 239-248.
52. Booth MC, Pence LM, Mahasreshti P, Callegan MC, Gilmore MS. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun* 2001; 69: 345-352.
 53. Moore PCL, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2760-2767.
 54. Ryding U, Flock JI, Flock M, Soderquist B, Cristenson B. Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1997; 176 : 1096-1009.
 55. Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ, Lee JC. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp, from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2998-3003.
 56. Sutra L, Rainard P, Poutrel B. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2253-2258.
 57. Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L, Fournier JM. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 38-40.
 58. Guidry A, Fattom A, Patel A, O'Brien C. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol* 1997; 59: 53-58.
 59. Sau S, Bhasin N, Wann ER, Lee JC, Foster TJ, Lee CY. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology* 1997; 143: 2395-2405.
 60. Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J Dairy Sci* 2000; 83: 1966-1975.
 61. Giraudo AT, Mansilla C, Chan A, Raspanti C, Nagel R. Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2003; 46: 246-250.
 62. Dassy B, Hogan T, Foster TJ, Fournier JM. Involvement of the accessory gene regulator (*agr*) in expression of type 5 capsular polysaccharide. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1301-1306.
 63. Luong T., Subrata S, Gomez M, Jean Lee C, and Chia Lee Y. Regulation of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Expression by *agr* and *sarA*. *Infect Immun* 2002; 70: 444-450.
 64. Williams RJ, Ward JM, Henderson B, Poole S, O'Hara BP, Wilson M, *et al.* Identification of a novel gene cluster encoding staphylococcal exotoxin-like proteins. characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun* 2000; 68: 4407-4415.
 65. Fitzgerald JR, Monday SR, Foster TJ, Bohach GA, Hartigan PJ, Meaney WJ, *et al.*, Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* 2001; 183: 63-70.
 66. Cenci-Goga BT, Karama M, Rossitto PV, Morgante RA, Cullor JS. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J Food Prot* 2003; 66: 1693-1696.
 67. Monday SR, Bohach GA. Genes encoding staphylococcal enterotoxins G and I are linked and separated by DNA related to other staphylococcal enterotoxins. *J Nat Toxins* 2001; 10: 1-8.
 68. Haveman LM, Fler A, Gerards LJ. Staphylococcal scalded skin syndrome in two very low birth weight infants. *J Perinat Med* 2003; 31: 515-519.
 69. Hayakawa Y, Hashimoto N, Imaizumi K, Kaidoh T, Takeuchi S. Genetic analysis of exfoliative toxin A-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk. *Vet Microbiol* 2001; 78: 39-48.
 70. Seki K, Sakurada J, Seong HK, Murai M, Tachi H, Ishii H, *et al.* Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals -special reference to correlation with size of protein-A gene. *Microbiol Immunol* 1998; 42: 407-409.
 71. Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Höök M. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesin to cartilage. *Mol Microb* 1993; 7: 99-107.
 72. Tsen HY, Chen TR. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992; 37: 685-690.
 73. Jarraud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G. Involvement of enterotoxin G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2446-2449.
 74. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3411-3414.