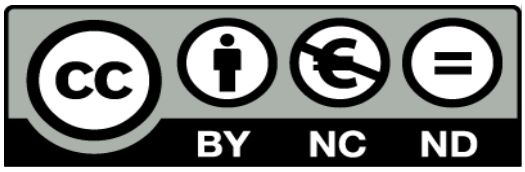
UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

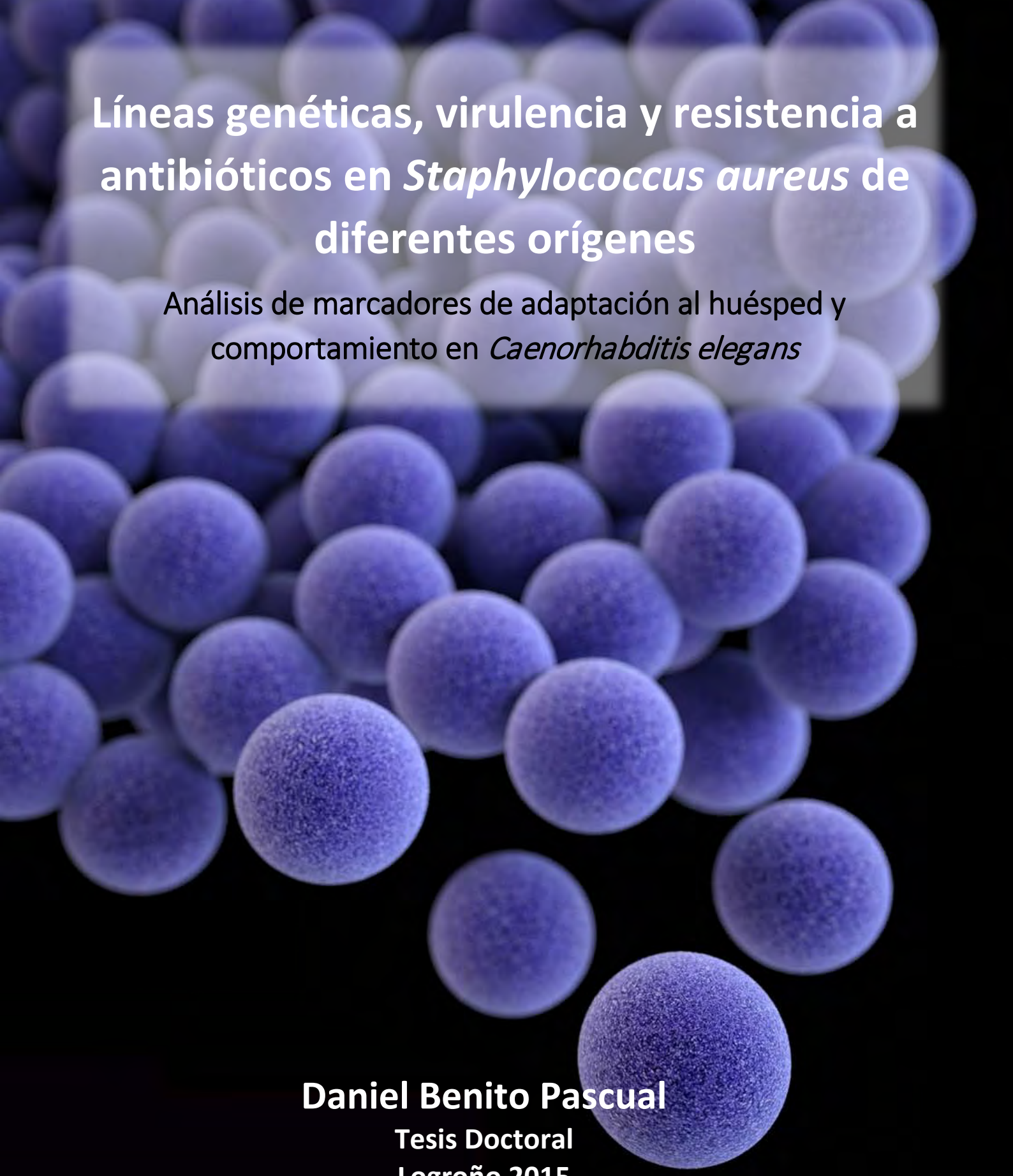
TESIS DOCTORAL

Título
Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes. Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*
Autor/es
Daniel Benito Pascual
Director/es
Carmen Torres Manrique
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2014-2015



Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes. Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*, tesis doctoral de Daniel Benito Pascual, dirigida por Carmen Torres Manrique (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2016
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es



Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes

Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*

Daniel Benito Pascual

Tesis Doctoral

Logroño 2015

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Universidad Zaragoza
1542

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de
Agricultura y Alimentación
Teléfono: 941 299 720
dpto.agricultura@unirioja.es

TESIS DOCTORAL

LÍNEAS GENÉTICAS, VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Staphylococcus aureus* DE DIFERENTES ORÍGENES. ANÁLISIS DE MARCADORES DE ADAPTACIÓN AL HUÉSPED Y COMPORTAMIENTO EN *Caenorhabditis elegans*.

Memoria presentada por **DANIEL BENITO PASCUAL** para optar al título de Doctor por la Universidad de La Rioja.

Logroño 2015

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de
Agricultura y Alimentación
Teléfono: 941 299 720
dpto.agricultura@unirioja.es

Dra. **CARMEN TORRES MANRIQUE**, Catedrática del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja

Por la presente declara que,

La memoria titulada "**LÍNEAS GENÉTICAS, VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Staphylococcus aureus* DE DIFERENTES ORÍGENES. ANÁLISIS DE MARCADORES DE ADAPTACIÓN AL HUÉSPED Y COMPORTAMIENTO EN *Caenorhabditis elegans***" que presenta Don **DANIEL BENITO PASCUAL**, Licenciado en Biología y Bioquímica, ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja, bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor,

Lo que hace constar en Logroño, a 6 de Noviembre de 2015.

Fdo.: Carmen Torres Manrique

“La Ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada”.

Karl R. Popper (Teórico y Filósofo)

A mi familia y a Raquel

Es curioso cada vez que nos paramos, miramos atrás y hacemos memoria de todo aquello que ha sido importante en nuestra vida, sobre todo porque nos extraña que momentos tan intensos parezcan tan efímeros en el recuerdo, o que una época que nos hizo crecer como personas quede en una simple anécdota contada una y otra vez…..pero son precisamente esas anécdotas las que conforman el **ADN** de nuestra vida y si de algo estoy seguro, es que en estos últimos 5 años he acumulado un montón de **A**mistad, **C**ompañerismo, **G**ratitud y **T**rabajo en la **U**niversidad de La Rioja.

"¡No quiero hacer la tesis!"….esa fue la primera y segunda e incluso tercera respuesta que le di allá por el 2010 a la Dra. Carmen Torres ante la pregunta del millón: "Oye, ¿por qué no haces la tesis?". Pues bien, 5 años después no puedo más que agradecer su insistencia porque ha sido un placer estar trabajando durante este tiempo codo con codo en el laboratorio, o viajando alrededor de España y Europa llevando nuestra investigación hasta reuniones y congresos de alto nivel científico. No sólo es destacable su profesionalidad, sino también sus valores humanos y su cercanía, que hicieron de su despacho un "hogar de trabajo". Gracias por confiar en mí y por catalizar, cual **taq**, la síntesis de esta tesis doctoral.

Tampoco quiero dejar de agradecer al resto del equipo del Departamento de Agricultura y Alimentación de la UR, el apoyo prestado ante cualquier duda o necesidad, tanto a Myriam Zarazaga por la incesante búsqueda de nuevos planteamientos que en ocasiones nos sirven como los **primers** a una PCR, así como agradecer a Fernanda Ruíz su gestión y búsqueda de los recursos necesarios para desarrollar nuestro trabajo en un marco de calidad y seguridad. A su vez debo agradecer a Carmen Tenorio sus valiosos consejos en mi iniciación a la docencia universitaria, o a Marta Dizy y Elena González por hacerme partícipe de la organización de varios congresos, que aunque agotadores, fueron muy enriquecedores como experiencia. Tampoco me olvido de Susana o Carmen por darle un aire diferente al laboratorio "de al lado" y por supuesto a Toño por dar respuesta a todas las cuestiones burocráticas.

Gracias a Carmen Aspiroz, Antonio Rezusta, Juan Miguel Rodríguez y Yolanda Gilaberte, entre otros, por darme la oportunidad de hacerme partícipe de vuestro trabajo y confiar en mí para estudiar algunas de las bacterias incluidas en esta tesis. Un placer colaborar con todos vosotros. Gracias a Alfonso Navas por permitirme hacer la estancia en su grupo de investigación en el MNCN-CSIC de Madrid, sin duda una gran familia profesional junto a Susana C. Arcos. Orgulloso de haber podido trabajar en vuestro laboratorio de referencia nacional. Y por supuesto, gracias al Ministerio de Economía y Competitividad por concederme una beca predoctoral FPI asociada al proyecto SAF2009-08570. Sin ella esta tesis no hubiera sido posible.

Pero, sin duda, otr@s grandes protagonistas han sido mis compañer@s de trabajo, con quienes he pasado tantas horas en el laboratorio y otras tantas fuera de él. Todos han formado parte de ese pequeño engranaje que hace que "todo encaje", tan necesario en la vida como los **dNTPs** en la biología molecular. Cada uno de ellos y cada una de ellas han contribuido a que esta tesis sea lo que es y un pedacito de ella pertenece a cada consejo, cada colaboración o simplemente cada momento de comprensión y escucha. Especialmente me gustaría hacer mención a aquellas personas con las que más me ha tocado compartir estos momentos: gracias a Carmencita por toda la sabiduría que aportó al grupo, ya que su trabajo previo fue la base de inspiración para mí y para otros tantos, además de transmitirme siempre esa alegría por la investigación. Gracias a Rocío y Paula, por hacerme ver que la vida depende del punto de vista desde el que la mires y que todo puede cambiar; Gracias por formar parte de ese "núcleo" del que surgió el verdadero espíritu del "Lab229", al menos el que yo sentí como nuestro y que espero que trascienda más allá de "esos cuatro años", algo que no dudo. No menos importantes sois todas las personas que os incorporasteis más tarde, gracias a Andrea por traernos un "idílico" buen rollo, tu energía y cariño dejan huella! No me olvido tampoco de Miriam, capaz de hacerte reír y levantarte el ánimo en lo que le cuesta dar una vuelta sobre sí misma! Gracias a mi "primo" Enrique, al gran Varela, a la serrana Marina o a la riojalteña Sara por traer nuevos aires y aportar vuestra energía al grupo, sin vosotros no hubiera sido lo mismo.

Gracias también a Vanesa por "querernos odiar a todos" y llevarnos por el camino del orden, sin ti el laboratorio no hubiera tenido ni tanto material ni tan buenos métodos. No me olvido de Sergio, mi compañero de poyata durante mi primera etapa y con quien compartí muchas charlas, o de Titus, una gran profesional de los Staphys que tanta paciencia tuvo conmigo y de la que tanto aprendí, y no sólo de las bacterias. Gracias también a Elena R. por guiarme en mis primeros pasos en la investigación y en la burocracia!

No me olvido del universo cibiriano, mi familia de congresos! Gracias a Yoli, Bea, Nerea y María por tan buenos ratos vividos a lo largo y ancho de España y Europa….allí donde vea "merchandising" me acordaré de vuestros sabios consejos, también aplicables a la ciencia, ya que siempre es recomendable "dar 2 vueltas". Tampoco me olvido de las últimas incorporaciones, os deseo mucha suerte Lidia y Cristina…y si necesitáis algo ya sabéis donde encontrarme.

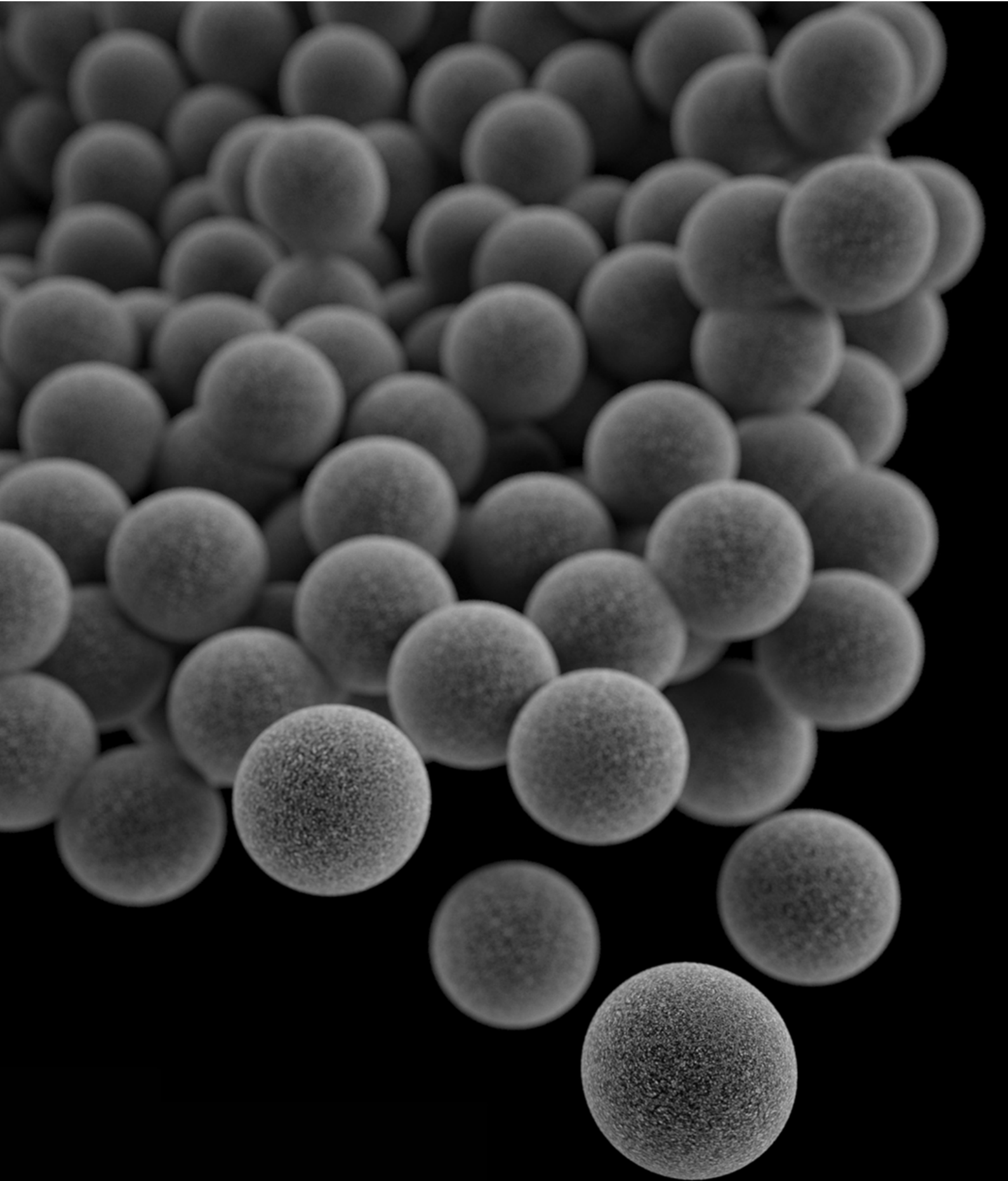
Gracias a todos aquellos que alguna vez pasaron por el laboratorio, ya sea de prácticas o de estancia: cómo olvidar a Cauré y su familia….se os echa de menos! Gracias a Nathalia Cirone por enseñarnos el lado más latino de la vida o a Filipe por mostrarnos que cada día puede ser

especial para sorprender, también a Dante por enseñarnos el poder de “un acento”. Gracias por todas las aportaciones y experiencias que he vivido con Margarida, Alejandro, Natalia, Sheila o Laura, así como con toda la gente de Túnez, en especial a Haythem, Rym, Laila y Sarra, o la gente de Argelia, especialmente Linda. Tampoco me olvido de los mejicanos, en especial de Rosa, Patty, Elena y Gerardo, gracias por ser tan buenos compañeros.

Quiero hacer mención especial a todos mis amigos y amigas fuera del ámbito científico, esa “familia” que uno elige. Gracias por vuestra interesante aportación a la ciencia a través de muestras nasales, cutáneas y otras menos agradables. Gracias por escucharme cuando tenía mucho que decir y por acompañarme cuando simplemente necesitaba desconectar. La amistad, **buffer** indispensable de la vida.

Tu tesis la comparte y la “sufre” también tu familia porque es complicado hacer comprender lo que haces cuando llegas tarde por tener que terminar una PCR o una hibridación, pero es reconfortante que te reciban siempre con una sonrisa o un abrazo. Por ello, mi familia ha sido uno de los pilares fundamentales en mi carrera científica pues nunca dudaron de mí y de mi capacidad para conseguir todo aquello que me propusiese. Gracias especialmente a mi madre, Mª Ángeles, por su paciencia, por su cariño incondicional, por enseñarme que la generosidad con los demás es un sello de garantía y por animarme siempre a mirar y apuntar alto; A mi padre, Vidal, por aconsejarme que en la vida es mejor avanzar sin prisa pero sin pausa y manteniendo siempre los pies en el suelo, siendo fiel a ti mismo; Y a mi hermana, Mónica, por enseñarme que la fuerza y el tesón siempre se pueden sacar de cualquier sitio para conseguir tus objetivos. No me olvido de mis sobrinos, Guille y Sergio, con quién siempre ha sido fácil desconectar y agradecer a todos los demás miembros de mi familia que siempre han confiado en mí. No imagino poder tener una familia mejor. Sé que estáis orgullosos de mi….pero yo lo estoy aún más de vosotros. Os quiero!

Raquel, gracias por estar a mi lado casi desde que elegí esta incierta carrera de la Bioquímica y la Biología Molecular. Gracias por hacerme crecer como persona a la vez que crecíamos como pareja, gracias por ofrecerme una sonrisa ante los malos días y por mantener siempre una expectativa optimista y alegre hacia el futuro. Gracias por la paciencia que has tenido en este largo camino llamado tesis y por el apoyo que he encontrado en ti cuando las cosas no salían bien. Tengo la suerte de poder recorrer la vida a tu lado….y no tengo ninguna duda que será una gran aventura. Te quiero niña ;)



Índice

Índice

ABREVIATURAS 3

RESUMEN 7

LISTA DE TABLAS 11

LISTA DE FIGURAS 15

INTRODUCCIÓN

1. *S. aureus*: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES 21

2. VERSATILIDAD DE *S. aureus*: MICROBIOTA NORMAL O PATÓGENO 22

3. *S. aureus* Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS. CONCEPTO SARM 24

4. *S. aureus* Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO β-LACTÁMICOS 26

5. FACTORES DE VIRULENCIA EN *S. aureus* 32

6. CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DE *S. aureus* 35

7. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus* MEDIANTE TIPADO MOLECULAR 38

7.1. Tipado del cassette cromosómico SCC*mec* 39

7.2. Tipado del locus *agr* estafilocócico 42

7.3. Tipado del Multi Locus Sequence Typing (MLST) 44

7.4. Tipado de la región polimórfica del gen *spa* 44

7.5. Electroforésis en campo pulsante (PFGE) 45

8. VARIABILIDAD GENÉTICA DE *S. aureus*. EGMs 46

9. EPIDEMIOLOGÍA DE SARM Y LÍNEAS GENÉTICAS 52

9.1. SARM asociado a ambientes hospitalarios (SARM-AH) 53

9.2. SARM asociado a la comunidad (SARM-AC) 55

9.3. SARM asociado a animales (SARM-AG) 57

9.4. SARM asociado a la cadena alimentaria 62

10. PATOGENIA DE *S. aureus* EN EL MODELO *C. elegans* 64

OBJETIVOS 69

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS ESTUDIADAS 73

1.1. Aislamientos clínicos 73

1.2. Casos clínicos 75

1.3. Cepas fecales de personas sanas 78

1.4. Cepas nasales y cutáneas de granjeros 78

1.5. Cepas de recién nacidos y madres lactantes 79

1.6. Cepas de alimentos 79

2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTOS DE LAS CEPAS 80

3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA 81

4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS 81

5. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE LAS CEPAS 84

6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) 84

7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 86

8. IDENTIFICACIÓN DE *S. aureus* Y SARM 86

9. TIPADO MOLECULAR DE LAS CEPAS OBTENIDAS 87

9.1. Tipado de la región polimórfica del gen *spa* 87

9.2. Tipado del locus *agr* 87

9.3. Tipado del MLST 88

9.4. Tipado PFGE 89

9.5. Tipado del SCC*mec* 91

10. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS 93

11. FACTORES DE VIRULENCIA 102

12. CLÚSTER DE GENES DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE (IEC) 107

13. ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES. BACTERIÓFAGOS 108

14. SECUENCIACIÓN 109

15. PATOGENÍA EN MODELO *C. elegans* 110

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS 115

1.1. SARM de hemocultivos y otros orígenes 115

1.2. Forunculosis recurrente familiar 125

1.3. SASM aislados en pacientes pediátricos con dermatitis atópica 127

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS SARM CC398 134

2.1. SARM CC398 en pacientes con y sin contacto con animales de granja 134

2.2. Casos clínicos CC398 142

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *S. aureus* DE INDIVIDUOS SANOS 149

3.1. *S. aureus* de muestras fecales 149

3.2. *S. aureus* de muestras nasales y cutáneas en granjeros 151

4. ESTUDIO DE TRANSFERENCIA DE *S. aureus* A TRAVÉS DE LA LACTANCIA 157

5. ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus* EN ALIMENTOS 163

6. ESTUDIO DEL CLÚSTER DE EVASIÓN INMUNE ESTAFILOCÓCICO 166

6.1. Tipos IEC mayoritarios en cada estudio 166

6.2. Tipos IEC en relación a la línea genética 171

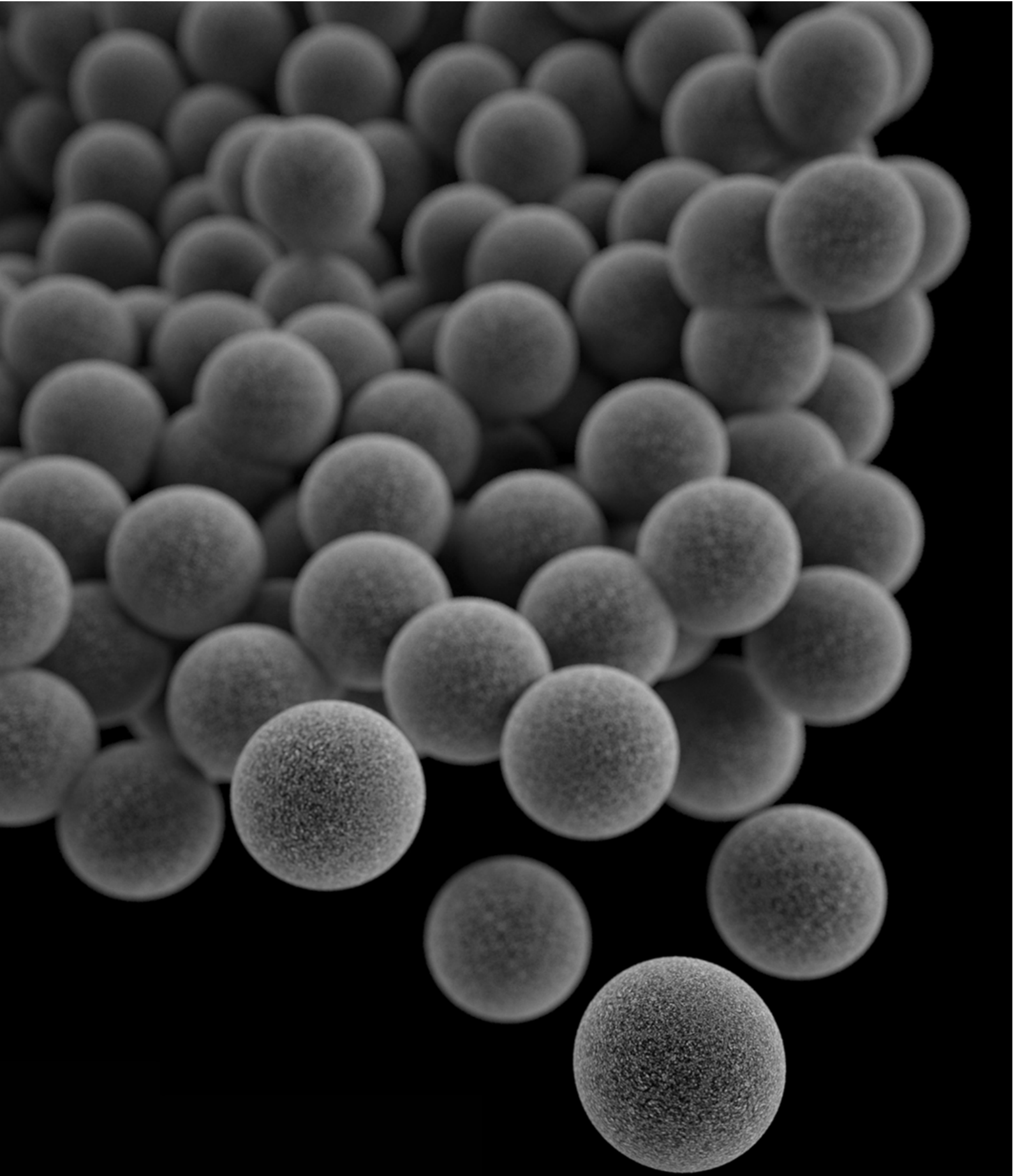
7. PATOGENIA DE *S. aureus* EN EL MODELO *C. elegans* 174

DISCUSIÓN 181

CONCLUSIONES 219

REFERENCIAS 223

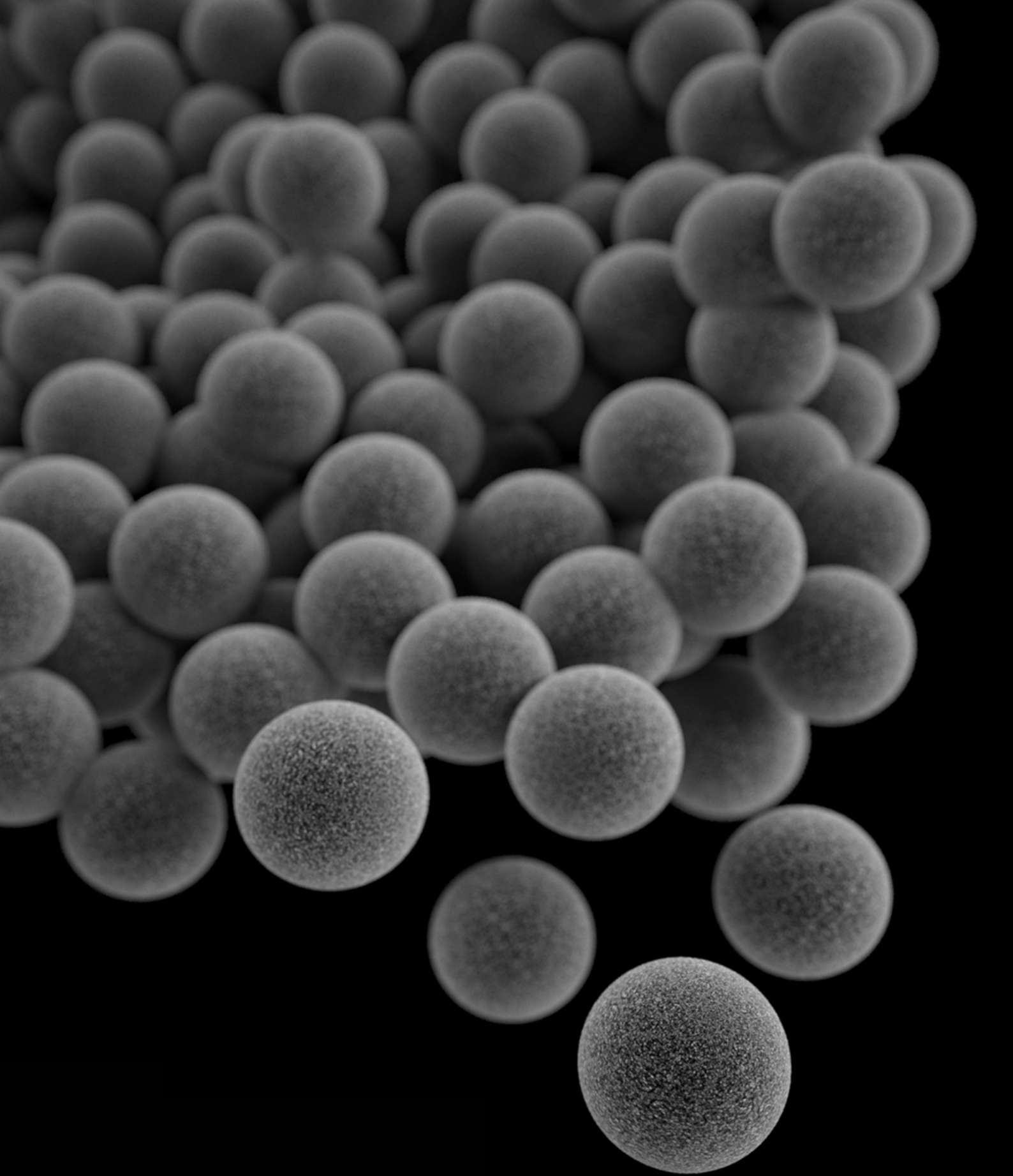
ANEXO 261



Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
agr	accessory gene regulator (gen regulador accesorio)
AIP	péptido autoinductor
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
BHI	brain Heart Infusion (medio de cultivo)
pb	pares de bases
CA-SFM	comité del Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología
CC	complejo clonal
CHIPS	proteínas inhibidoras de la quimiotaxis
CIP	ciprofloxacino
CLI	clindamicina
CLO	cloranfenicol
CLSI	clinical and Laboratory Standars Institute
CMI	concentración minima inhibitoria
DA	dermatitis atópica
DHFR	enzima dihridofolato reductase
EARSS	vigilancia europea de la Resistencia a antimicrobianos
EFSA	Agencia europea de la seguridad alimentaria
EGMs	elementos genéticos móviles
eBURST	based Upon Related Sequence Types
ERI	eritromicina
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FE-G	factor de elongación G
FOX	cefoxitina
FUS	ácido fusídico
GEN	gentamicina
HRV-Z	Hospital Royo-Villanova de Zaragoza
HUMS-Z	Hospital universitario Miguel Servet de Zaragoza
I	resistencia intermedia
IEC	immune evasión cluster (clúster de evasión inmune)
KAN	kanamicina
LPV	leucocidina de Panton-Valentine
L	lincosaminas
LSA	lincosaminas y estretograminas A
MLS	macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas
MLS_B	macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas de tipo B
MS	macrólidos-Estreptograminas
MLST	multilocus Sequence Typing
MSA	manitol-Sal Agar
ORSAB	oxacillin Resistance Screening Agar Base (medio de cultivo)
OXA	oxacilina
PBP	penicillin-binding-protein (proteína de unión a penicilina)
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	electroforesis en campo pulsante
R	resistente
S	sensible
SA	estreptograminas A
SAK	estafilokinasa
SB	estreptograminas B
SARM	*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina
SARM-AC	*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina comunitario

SARM-AH	*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina hospitalario
SARM-AG	*Staphylococcus aureus* asociado a ganado
SARM-TET^{R}	*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y tetraciclina
SASM	*Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina
SCC*mec*	cassette estafilocócico cromosómico del gen *mecA*
SCIN	inhibidor estafilocócico del complemento
SCN	*Staphylococcus* coeagulasa negativo
SCORAD	Scoring atopic dermatitis score
SCP	*Staphylococcus* coagulasa positivo
spa	*Staphylococcus* protein A gene (gen de la proteína A de *Staphylococcus*)
spp	especie
ST	secuencia tipo (MLST)
STR	estreptomicina
SXT	trimetoprim-sulfametoxazol
TET	tetraciclina
TOB	tobramicina
TSST	toxina del síndrome del shock tóxico
UR	Universidad de La Rioja
V	voltios
VAN	vancomicina
WT	wild type



Resumen

Staphylococcus aureus forma parte de la microbiota normal nasofaríngea e intestinal del ser humano y de muchos animales; sin embargo, también es un importante patógeno oportunista, estando involucrado en numerosas infecciones nosocomiales y comunitarias. Por otro lado, este microorganismo posee una gran capacidad para adquirir determinantes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, estando algunos de ellos implicados de manera directa en intoxicaciones alimentarias. La evidencia de su gran ubicuidad y su capacidad para interactuar en sus diferentes nichos naturales mediante zoonosis o antropozoonosis, hacen necesaria la realización de estudios genéticos que determinen la estructura poblacional de este microorganismo en diferentes ambientes, patologías y nichos biológicos, con el fin de llevar a cabo un seguimiento epidemiológico y molecular de las líneas genéticas predominantes y tratar de acotar las características de los diferentes clones.

Para ello se han llevado a cabo varios estudios en esta tesis que se han vertebrado en tres cuestiones fundamentales: *S. aureus* en el ámbito clínico y comunitario, *S. aureus* en el ámbito alimentario y nutricional y la posible interrelación con el ecosistema animal. Para ello se ha realizado la caracterización de mecanismos de resistencia y de los determinantes de virulencia y el tipado molecular de las cepas de *S. aureus de* los diferentes orígenes, así como un ensayo de patogenicidad en el modelo animal *C. elegans*.

En primer lugar se analizaron las líneas genéticas de los 144 aislados SARM obtenidos en el Hospital RV-Z en el periodo 2007-2011. Se evidenció la hegemonía del complejo clonal CC5, detectado en el 80% de los aislados SARM. Por otro lado, destaca la línea genética t067-ST125/CC5, especialmente en aislamientos de carácter más invasivo (hemocultivos, 66,7%), y en menor frecuencia en los de otros orígenes (37,1%). Dicha línea genética presentó un alto contenido en genes de resistencia y en general se asoció al IEC tipo F. En el 9% de los aislados SARM de detectó la línea genética ST228, y en su mayor parte fueron tipados como t109 e IEC tipo D, presentando resistencia a mupirocina.

Posteriormente, se caracterizaron cepas clínicas de *S. aureus* implicadas en patologías específicas como la dermatitis atópica (DA) en pacientes pediátricos o la forunculosis recurrente. En las muestras cutáneas y nasales de pacientes con DA se detectaron cepas SASM, siendo el 25% de las mismas del complejo clonal CC30, en su mayor parte portadoras del gen *tsst*-1. Este complejo clonal CC30, en su variante SARM y con presencia del gen *pvl*, fue detectado en el caso de forunculosis recurrente familiar.

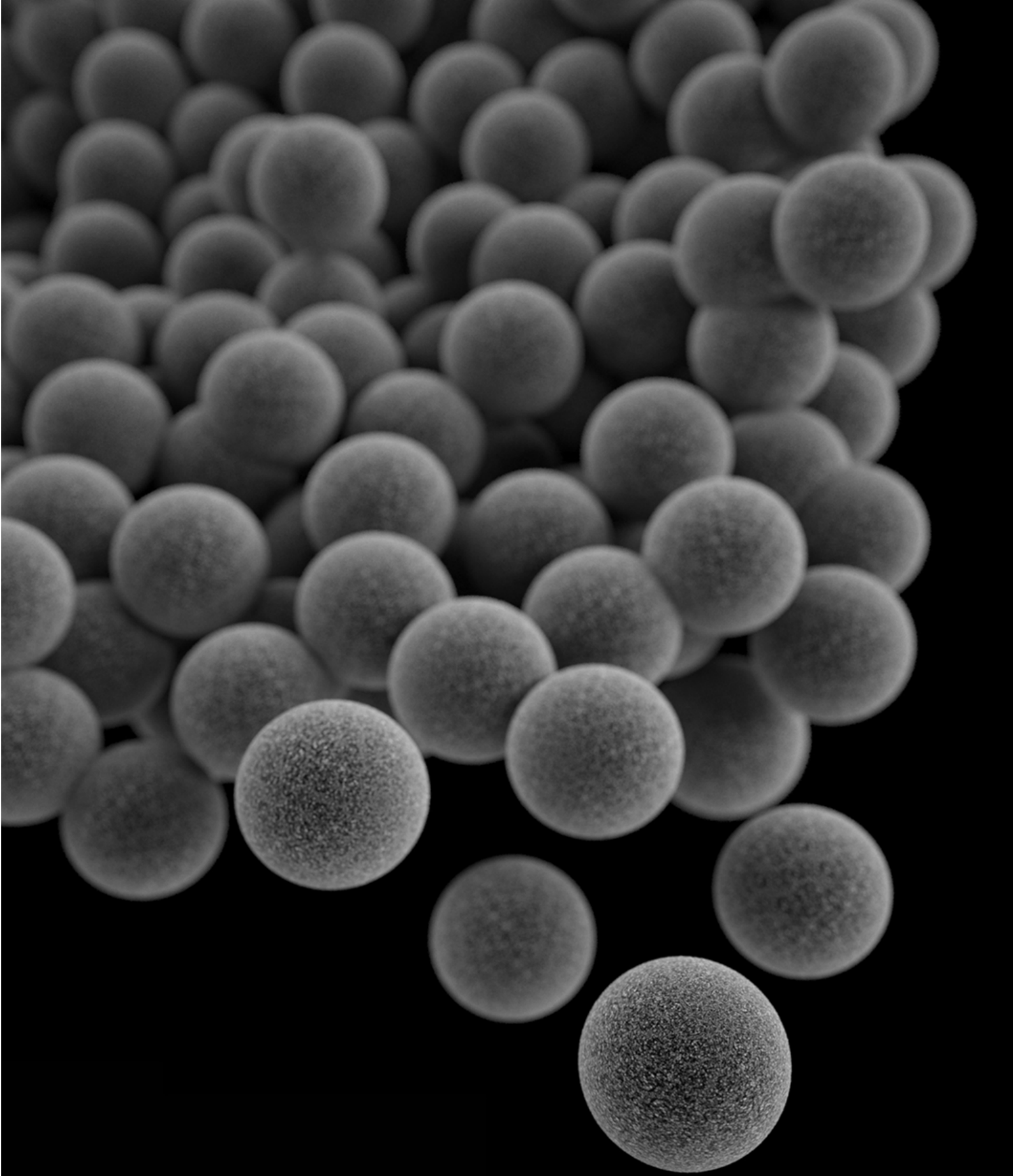
El siguiente objetivo fue determinar si la resistencia a la tetraciclina (TET^R) era un buen marcador de la línea genética CC398 en aislados SARM y asimismo si el contacto con animales de granja era un factor de riesgo de colonización y/o infección por SARM-CC398. Para ello, se caracterizaron todos los aislados clínicos SARM-TET^R obtenidos en el Hospital UMS-Z

durante el periodo 2011-2012 (n=98) y se realizó encuesta epidemiológica de los pacientes. El 60,2% de las cepas SARM-TET^R fueron adscritas al complejo clonal CC398. Se observaron diferencias significativas en la prevalencia de CC398 en los pacientes que indicaron tener contacto con animales de granja (76%), en relación con los que no referían dicho contacto (50%) ($p>0,05$). Esto demuestra que la tetraciclina es un buen marcador de detección de dicha línea genética, que el contacto con animales de granja es un factor de riesgo de colonización/infección y que la transferencia humano-humano puede estar también ocurriendo. A partir de otros estudios epidemiológicos complementarios llevados a cabo en esta tesis, en exgranjeros o personal con exposición prolongada a animales de granja, se evidenció la capacidad evolutiva de esta línea genética para adquirir o perder material genético con fines adaptativos a diferentes nichos biológicos.

El siguiente objetivo fue determinar el nivel de colonización por *S. aureus* en individuos sanos con distinto grado de contacto con animales de granja. En primer lugar se analizaron muestras fecales de 100 individuos sanos sin relación laboral con animales de granja y en el 15% de los mismos se detectó SASM con una amplia variedad de tipos *spa* y secuencias tipo. Destaca la detección de aislados ST398 y ST133, tradicionalmente ligados a animales. Posteriormente se analizó la dinámica de colonización nasal a lo largo de un año en una familia de granjeros (n=11) con diferente nivel de contacto con los animales de la granja. El 63,6% de los individuos eran portadores nasales de SASM, siendo un 27,3% portadores continuos de la misma línea genética de *S. aureus* (CC9, CC22, CC45). Uno de los granjeros presentó una lesión cutánea leve a partir de la cual se aisló SARM de la línea emergente t843-ST130/CC130 y portador del gen *mecC*, representando un posible caso de zoonosis.

Posteriormente se analizó la tasa de contaminación por *S. aureus* y SARM en muestras cárnicas con valores del 7% y 1%, respectivamente. Se detectó SARM-CC398 en una muestra porcina, evidenciándose la posible transferencia de dicha línea genética a través de la cadena alimentaria. El uso de marcadores de adaptación al huésped (IEC) indicó el posible origen animal de la cepa SARM (CC398), así como el posible origen humano de las cepas SASM. De la misma manera se confirmó que la lactancia era una vía más de transmisión de *S. aureus*, detectándose cepas idénticas en la leche materna y en la microbiota intestinal del bebé, observándose un alto grado de implantación intestinal.

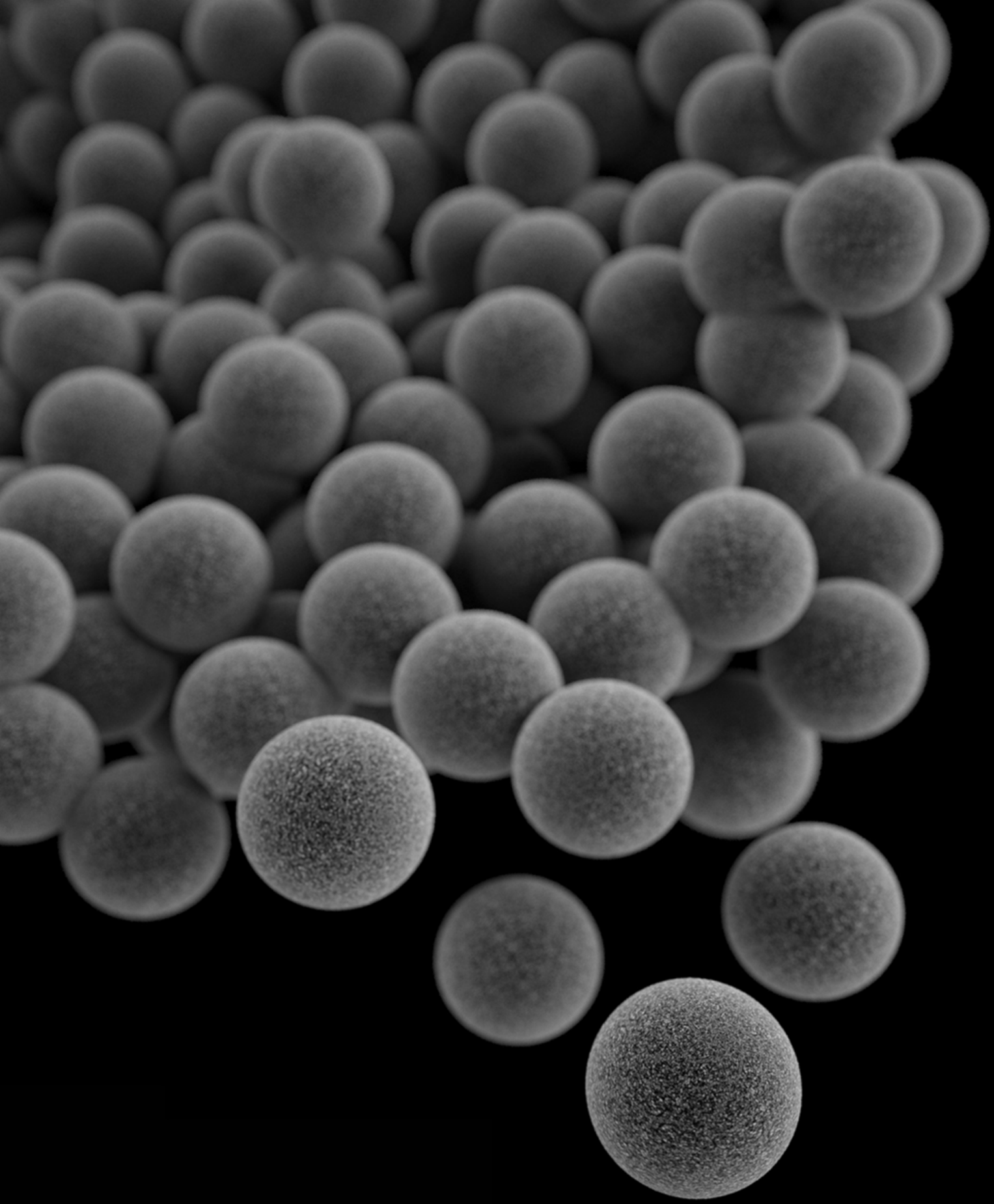
Por último se analizó la patogenia de *S. aureus* en el modelo *C. elegans* en cepas con diferentes características genéticas. Se observó relación entre el nivel de patogenicidad de las cepas con presencia de casetes cromosómicos (*SCCmec*) y fragmentos transducidos por bacteriófagos.



Lista de tablas

Tabla 1. Principales infecciones y enfermedades producidas por *S. aureus.*
Tabla 2. Clasificación de las toxinas detectadas en *S. aureus* en función del cuadro clínico.
Tabla 3. Tipos de SCC*mec* de *S. aureus* y combinación de constituyentes.
Tabla 4. Genes de resistencia localizados en EGMs dentro del SCC*mec.*
Tabla 5. Principales diferencias entre SARM-AH y SARM-AC.
Tabla 6. Tasas de contaminación alimentaria por SARM .
Tabla 7. Cepas SARM totales aisladas del paciente y de sus familiares en el caso clínico de la forunculosis recurrente familiar.
Tabla 8. Cepas SARM aisladas de muestras nasales y cutáneas del paciente, de sus familiares y los cerdos de la granja relacionada con los integrantes del caso clínico 1.
Tabla 9. Cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes muestras con significancia clínica y epidemiológica de los pacientes de los casos clínicos 2-4 relacionados con la línea genética ST398.
Tabla 10. Carga de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por el CLSI o EUCAST para *S. aureus*.
Tabla 11. Carga de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por el Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie (CA-SFM) para *Staphylococcus* spp.
Tabla 12. Criterios para los rangos de resistencia (R), resistencia intermedia (I) y sensibilidad (S) utilizados en este estudio. (CLSI. 2014)
Tabla 13. Reactivos utilizados en la técnica de PCR para un volumen final de 50 µL con la enzima BioTaq DNA polimerasa (Bioline).
Tabla 14. Reactivos utilizados en la técnica de PCR para un volumen final de 50 µL con Taq-Takara DNA Polimerasa (Takara).
Tabla 15. Secuencia de cebadores empleados para la identificación de *S. aureus* y SARM.
Tabla 16. Secuencia de cebadores empleados para el tipado del gen *spa* y condiciones de amplificación.
Tabla 17. Secuencia de cebadores empleados para el tipado de *agr* y condiciones de amplificación.
Tabla 18. Secuenciade cebadores empleados para el MLST de *S. aureus*.
Tabla 19. Secuencia de cebadores empleados para la determinación del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) y condiciones de amplificación.
Tabla 20. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a meticilina.
Tabla 21. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.
Tabla 22.- Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a penicilina.
Tabla 23. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.
Tabla 24. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos.
Tabla 25. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a trimetoprim.
Tabla 26. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a fenicoles.
Tabla 27. Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *grlA* y *gyrA*.
Tabla 28. Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación del ARNr 23S y de los genes codificantes de las proteínas L3, L4 y L22.
Tabla 29. Secuencia de los cebadores y condiciones empleadas para la amplificación de los genes *mupA* e *ileS*.

Tabla 30.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *fusA, fusB* y *fusC*.
Tabla 31. Secuencia de los cebadores empleados en las PCRs simples para la amplificación de genes codificantes de factores de virulencia.
Tabla 32. Secuencia de los cebadores empleados en las tres PCRs múltiples para la amplificación de los genes codificantes de las 18 enterotoxinas.
Tabla 33.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección del gen *aur, cna* y *bap*.
Tabla 34.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección de los genes del sistema IEC.
Tabla 35. Secuencia de los cebadores empleados para la detección de las integrasas de cada familia de fagos.
Tabla 36.- Caracterización molecular de las 39 cepas SARM procedentes de hemocultivos del Hospital RV-Z incluídas en éste estudio.
Tabla 37.- Caracterización molecular de las 105 cepas SARM aisladas en el Hospital RV-Z, consideradas en función del origen de la muestra.
Tabla 38.- Cronología de aislamiento de las 12 cepas estudiadas y tipado molecular .
Tabla 39. Características de las 26 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras cutáneas procedentes de pacientes pediátricos con DA.
Tabla 40. Características de las 14 cepas de *S. aureus* aisladas de frotis nasales procedentes de pacientes pediátricos con DA.
Tabla 41. Características de los aislados de *S. aureus* de pacientes con DA en los que se detectaron *S. aureus* en muestras cutáneas y nasales de manera simultánea.
Tabla 42. Características de las 25 cepas SARM-TET^R procedentes de pacientes que referían contacto con animales de granja (Grupo A).
Tabla 43. -Características de las 42 cepas SARM-TET^R procedentes de pacientes que referían NO haber tenido contacto con animales de granja (Grupo B).
Tabla 44. -Características de las 31 cepas SARM-TET^R procedentes de los pacientes sin información sobre su contacto con animales de granja (Grupo C).
Tabla 45. Características de las 13 cepas SASM/SARM estudiadas depersonas y de cerdos de la granja procedentes del caso clínico 1.
Tabla 46. Comparativa de los resultados de PFGE tras la digestión con *cfr9-I* de las 11 cepas adscritas al complejo CC398 de origen humano y animal pertenecientes al caso clínico 1.
Tabla 47. Características de las cepas de *S. aureus* procedentes de los casos clínicos 2, 3 y 4.
Tabla 48. Caracterización molecular de las 15 cepas *S. aureus* procedentes de muestras fecales de individuos sanos.
Tabla 49. Características de los 11 individuos incluidos en éste estudio y periodos de muestreo a lo largo de 1 año.
Tabla 50. Características de los 18 *S. aureus* aislados de muestras nasales y cutáneas de la familia de granjeros incluidos en este estudio, procedentes de 9 de 11 individuos testados.
Tabla 51. Cepas *de S. aureus* obtenidas de los lactantes y de sus madres en los 12 casos positivos detectados de las 21 parejas madre-niño analizadas.
Tabla 52. Características de los 26 aislados de *S. aureus* obtenidos en los 4 casos con transferencia potencial madre-lactante.
Tabla 53. Características de los 15 aislados de *S. aureus* obtenidos del resto de casos donde no se demostró transferencia madre-lactante
Tabla 54. Cepas incluidas en el estudio de la clonalidad por PFGE, algunas de sus características moleculares y patrones PFGE encontrados.
Tabla 55. Características de las 7 cepas *S. aureus* detectadas en las muestras cárnicas analizadas.
Tabla 56. Características moleculares y resultado de virulencia de las 15 cepas de *S. aureus* testadas en el modelo patogénico animal *de C. elegans***.**

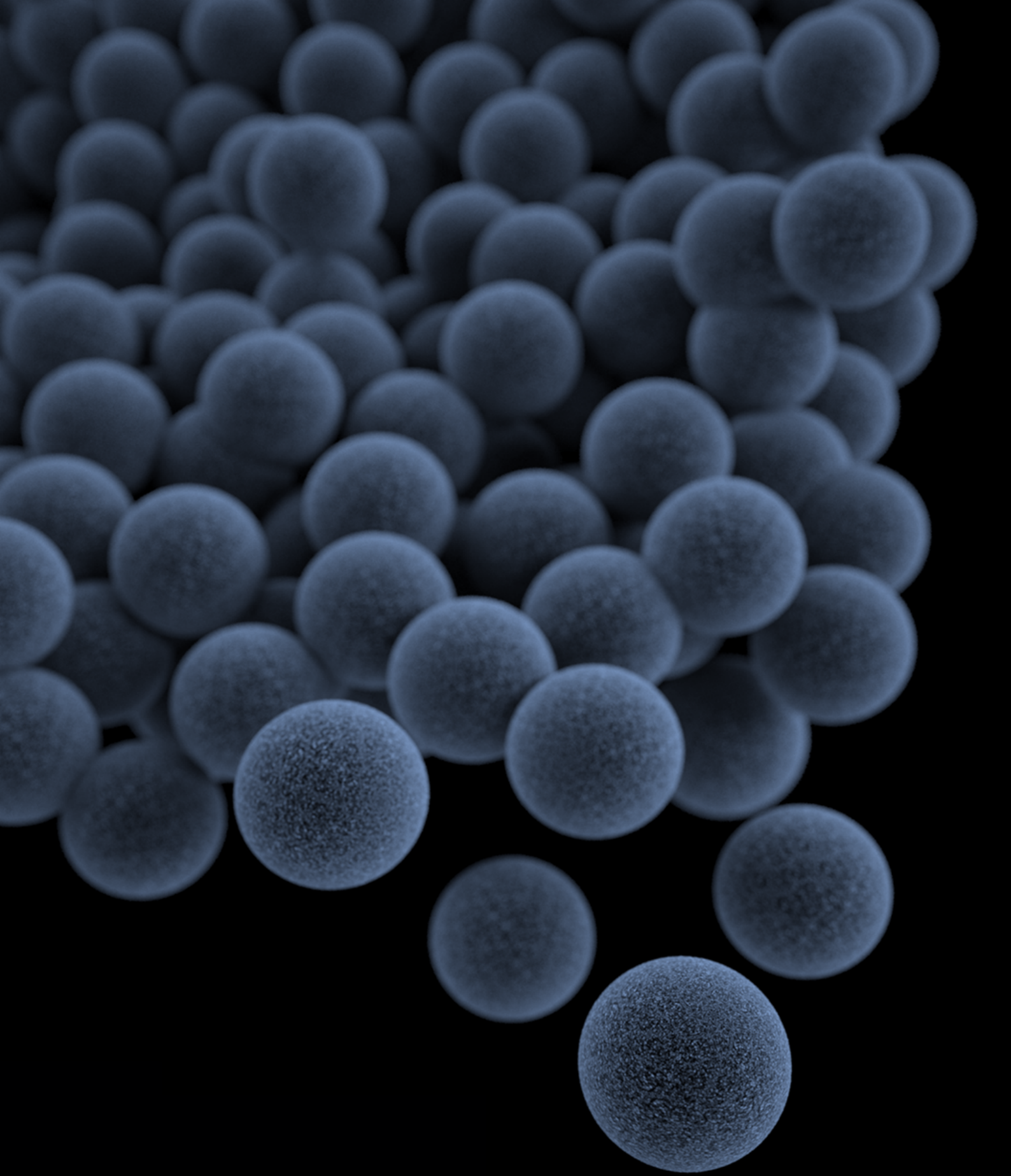


Lista de figuras

Figura 1. A: *S. aureus* en tinción Gram; B: *S. aureus* con Microscopio electrónico; C: imagen aumentada *S. aureus.*
Figura 2. 1) Técnica de la Coagulasa:A: coagulasa positiva; B: coagulasa negativa. 2) *S. aureus* en MSA. 3) *S. aureus* meticilin resistente en ORSAB. 4) *S. aureus* en agar sangre con halos hemolíticos.
Figura 3. Esquema de los principales mecanismos de resistencia asociados a *S. aureus.*
Figura 4. Dianas de los agentes antimicrobianos en *S. aureus.*
Figura 5. Principales factores de virulencia, factores de adhesión y colonización y mecanismos de evasión del sistema inmune humano en *S. aureus.*
Figura 6. Representación de partes que conforman el SCC*mec*: compejo *mec, ccr y* regiones *J*
Figura 7. Clases del complejo *mec* de *S. aureus .*
Figura 8. Esquema representativo de la organización y funcionamiento del locus *agr.*
Figura 9. Representación de los genes « housekeeping » utilizados para la técnica MLST y del gen *spa.*
Figura 10. Representación de las principales vías de transmisión de los EGMs.
Figura 11. Esquema simplificado de algunos de los transposones más representativos en *S. aureus.*
Figura 12. Diagrama simplificado de las principales líneas genéticas de *S. aureus* en relación al entorno en el que han sido detectadas.
Figura 13. Prevalencias por SARM en aislamientos invasivos en 2007 y 2013. Informes realizados por la ECDC.
Figura 14. Líneas genéticas mayoritarias (complejos clonales) de SARM-AH a nivel global.
Figura 15. Líneas genéticas mayoritarias (complejos clonales) de SARM-AC a nivel global.
Figura 16. Principales líneas genéticas detectadas en diferentes especies animales con potencial zoonótico en el hombre.
Figura 17. Principales líneas genéticas detectadas en diferentes alimentos de orígen animal de consumo humano.
Figura 18. A) Anatomía general de *C. elegans* (Simon Fraser University) B) *C. elegans* al microscopio electrónico . C) Ciclo biológico de *C. elegans.*
Figura 19. Origen de las 105 cepas SARM obtenidas durante el período 2010-2012 (en esta serie se excluyen los aislados de hemocultivos).
Figura 20. Origen de los 98 aislados SARM-TET^{R} obtenidos en el Hospital UMS-Z .
Figura 21. Ida) Origen de los 40 aislados de pacientes con DA.
Figura 22. Nº pacientes DA (dcha) y tipo SCORAD (izda).
Figura 23. Distribución de las muestras recogidas en función de su origen animal.
Figura 24. Método microbiológico de aislamiento de *S. aureus* y de SARM.
Figura 25. Observación microscópica de los cocos gram positivos y placa de DNasa tras la adición del ácido chlorhídrico.
Figura 26. Cepa con resistencia inducible a la clindamicina (D-test positivo).
Figura 27. Representación del locus *agr* con la localización de los cebadores utilizados para la amplificación de la región hipervariable que delimita los diferentes grupos. El cebador pan *agr* fue el cebador reverse utilizado para la detección de los cuatro tipos de locus *agr*.
Figura 28. Gel con los tamaños de los amplicones de las 18 enterotoxinas: a) primera PCR múltiple; b) segunda PCR múltiple; c) tercera PCR múltiple.
Figura 29. Estructura del sistema IEC (tomada de van Wamel *et al*., 2006).
Figura 30. Diferentes tipos de IEC, atendiendo a la combinación de los genes estudiados (tomada de van Wamel *et al*., 2006).
Figura 31. Protocolo de preparación de ensayo de patogenicidad (muerte/supervivencia) de *C. elegans* en placas de *S. aureus.*
Figura 32. Número de cepas SARM y SASM obtenidas respecto del total de *S. aureus* durante el período 2007/2011.

Figura 33. Líneas genéticas detectadas entre las 39 cepas SARM aisladas de hemocultivos en base al tipo *spa* y al ST.
Figura 34. Porcentaje de resistencia a antibióticos detectados en las 39 cepas SARM de hemocultivos del Hospital RV-Z. CIP, ciprofloxacino; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; MUP, mupirocina; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; CLO, cloranfenicol; TET, tetraciclina.
Figura 35. Líneas genéticas detectadas entre las 105 cepas clínicas SARM aisladas de diferentes localizaciones (no hemocultivos) en el Hospital RV-Z, en base al tipo *spa* y al ST.
Figura 36. Líneas genéticas detectadas entre las 105 cepas SARM aisladas de diversos orígenes (excepto hemocultivos) en el Hospital RV-Z, en relación al origen de las muestras. (F.epidem: frotis epidemiológico; PPB: piel y partes blandas; H. Quirúrgica: herida quirúrgica).
Figura 37. Porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos detectados en las 105 cepas SARM del estudio, considerando por separado las de significación clínica y las de control epidemiológico. CIP, ciprofloxacino; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; MUP, mupirocina; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; CLO, cloranfenicol; TET, tetraciclina; FUS, ácido fusidico; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.
Figura 38. Cronología, evolución y actuación en el caso clínico por forunculosis recurrente.
Figura 39. Distribución de CCs detectados en las cepas de *S. aureus* de origen cutáneo de pacientes pediatricos con DA.
Figura 40. Distribución de las líneas genéticas mayoritarias entre los 14 aislados de *S. aureus* procedentes de frotis nasales de 14 pacientes pediátricos con DA.
Figura 41. Comparativa de los porcentajes de resistencia entre las cepas de *S. aureus* de origen cutáneo y nasal de pacientes con DA .
Figura 42. Porcentaje de cepas SARM-TET^{R} en función de las líneas genéticas detectadas en los 3 grupos estudiados: A) contacto con animales de granja; B) no contacto con animales de granja; y C) sin datos de contacto con animales de granja.
Figura 43. Porcentaje de cepas SARM-TET^{R} relacionadas con el tipo de muestras de las que fueron aisladas. IPPB, infecciones de piel y partes blandas. El porcentaje de cepas se muestra encima de las barras.
Figura 44. Porcentaje de cepas SARM-TET^{R} resistentes a antimicrobianos en relación con los complejos clonales predominantes (CC398, CC1, CC5). ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; MUP, mupirocina; TET, tetraciclina; FUS, ácido fusidico; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.
Figura 45. Genes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas SARM-TET^{R} en relación con los complejos clonales mayoritariamente detectados (CC398, CC1, CC5).
Figura 46. Resultado PFGE de las cepas del caso clínico 1 digeridas con la enzima *cfr9-I.*
Figura 47. Distribución de los complejos clonales predominantes entre las 15 cepas SASM aisladas de muestras fecales de individuos sanos .
Figura 48. Proporción de cepas *S. aureus* o SARM detectadas en relación al origen de la muestra.
Figura 49. Distribución de los complejos clonales predominantes entre las 18 cepas *S. aureus* aisladas de muestras nasales y cutáneas procedentes de 9 de los 11 individuos de la familia de granjeros .
Figura 50. Comparativa de los fenotipos de resistencia entre las cepas de origen cutáneo y nasal. OXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; KAN, kanamicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; STR, estreptomicina; TET, tetraciclina; MUP, mupirocina; FUS, ácido fusídico.
Figura 51. Distribución de los complejos clonales predominantes entre las 41 cepas *S.aureus* procedentes de madres y lactantes.
Figura 52. Resultado del análisis por PFGE-*SmaI* de las cepas de *S. aureus* pertenecientes a los 4 casos con potencial transferencia madre-lactante. Las líneas 1 a 8 pertenecen a aislados de los casos 1 y 2. Las líneas 9 a 11 pertenecen a aislados del caso 3. Las líneas 12 y 13 pertenecen a las cepas del caso 4.

Figura 53. Proporción de muestras de carne de cerdo contaminadas por *S. aureus* (n=35) a la izquierda. Proporción de muestras cárnicas contaminadas por *S. aureus* en el total de muestras estudiadas (n=100) en el centro. Proporción de carne de pollo contaminadas por *S. aureus* (n=31) a la derecha.
Figura 54. Distribución de las líneas genéticas detectadas entre las cepas *S. aureus* aisladas de las 100 muestras cárnicas.
Figura 55. Distribución de los distintos tipos IEC detectados en cepas clínicas SARM en relación con los distintos origenes de las mismas.
Figura 56. Distribución de los distintos tipos IEC detectados relacionados con los distintos origenes de las cepas clínicas SASM estudiadas en pacientes con DA.
Figura 57. Proporción de los tipos IEC en relación el origen de las cepas de *S. aureus* analizadas en esta tesis.
Figura 58. Proporción de los tipos IEC en relación a las líneas genéticas mayoritarias detectadas en esta tesis.
Figura 59. Proporción de cepas IEC positivas o negativas atendiendo a la resistencia a meticilina relacionada a cada complejo clonal.
Figura 60. Representación simplificada (media de los porcentajes) de la supervivencia observada en cada uno de los grupos anteriorermente citados (A, IA, IB, B)
Figura 61. Análisis de los datos obtenidos mediante Análisis Factorial de Correspondencias (Statistica v. 6.0). Disposición de las variables en el espacio factorial definido. A) según los ejes 1-2; B) según los ejes 1-3.



Introducción

“En el punto donde se detiene la ciencia, empieza la imaginación”

Thor Heyerdhal (Explorador y Biólogo)

1. *Staphylococcus aureus* : CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES

S. aureus se identificó por primera vez en 1880 por el cirujano Alexander Ogston en un exudado purulento procedente de un absceso. Demostró que cocos agrupados en forma de racimo eran causantes de algunos abscesos piógenos en humanos. En 1884, Friederich Julius Rosenbach acuñó su nombre binomial procedente de los términos griegos *staphylé* (racimo) y *kokkus* (frutilla, uva) y del término griego *aureus* (dorado). Desde entonces, los avances en la ciencia han permitido distinguir las principales características de este importante microorganismo, el más virulento de todo el género. Se trata de una bacteria perteneciente a la familia *Micrococcaceae,* anaerobia facultativa, con perfil mesófilo y halotolerante y con morfología de cocos Gram positivos que en cultivo crecen formando racimos (**Figura 1**).

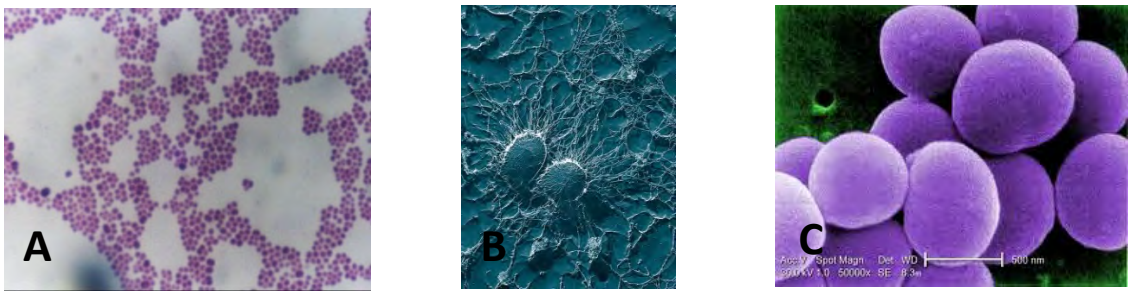


Figura 1. A: *S. aureus* en tinción Gram; B: *S. aureus* con Microscopio electrónico; C: imagen aumentada *S. aureus*

Es un estafilococo coagulasa positivo (SCP), lo que lo diferencia de otras especies coagulasa negativas (SCN) del género (como *S. epidermidis, S. saprophyticus, S. haemolylicus o S. lugdunensis,* entre otros). A su vez es capaz de metabolizar ácidos nucleicos gracias a la producción de enzimas desoxirribonucleasas que degradan el ADN, por lo que es considerada como “DNasa positiva”.

Su crecimiento en medio de cultivo es variable, dando lugar a colonias más o menos grandes en medio BHI. Uno de los medios de cultivo más utilizados para su identificación y aislamiento es el medio Manitol-Sal-Agar (MSA), donde podremos distinguir *S. aureus* por su capacidad de crecimiento en medios con sal (naturaleza halotolerante) y su capacidad de metabolizar el manitol. La existencia de reactivos sensibles al pH en este medio, dará lugar al viraje del color de la placa desde el rosa (condiciones iniciales) a amarillo (cultivo positivo para *S. aureus* por digestión del manitol). Otro de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento selectivo es el medio ORSAB, donde no sólo se discrimina la presencia de *S. aureus*, sino también su resistencia a meticilina, uno de los antibióticos más importantes en clínica como veremos en los siguientes apartados. Con crecimiento positivo, la placa ORSAB tornará desde el gris (condiciones iniciales), hasta el azul eléctrico (cultivo positivo en SARM). En agar sangre

muchas de las cepas son hemolíticas, por lo que crearán halos alrededor de la zona de formación de colonia (**Figura 2**).

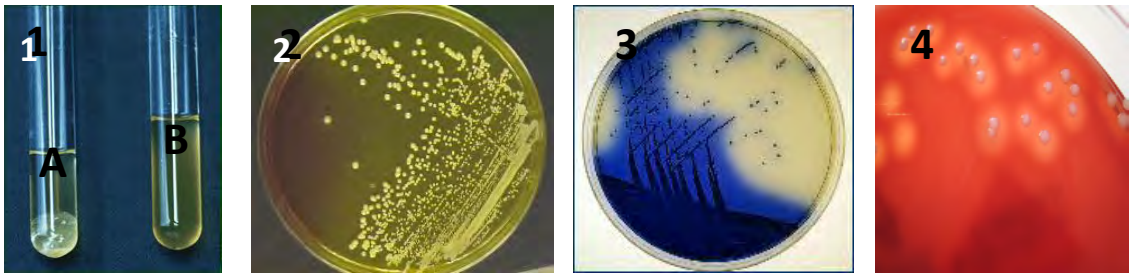


Figura 2. 1) Técnica de la Coagulasa:A: coagulasa positiva; B: coagulasa negativa. 2) *S. aureus* en MSA. 3) *S. aureus* meticilin resistente en ORSAB. 4) *S. aureus* en agar sangre con producción de β-hemólisis.

La alusión al color dorado se debe a que es capaz de producir un compuesto carotenoide, denominado estafiloxantina, cuyas propiedades han sido asociadas a la evasión del sistema inmune del hospedador, por desintoxicación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) producidas por los neutrófilos en su acción fagocítica. Se ha visto que no todos los *S. aureus* producen este compuesto, limitando su capacidad de formación de abscesos en la piel, como algunos autores han sugerido (Daum et al., 2008). Por ello, el bloqueo de la biosíntensis de la estafiloxantina podría ser una diana terapéutica a tener en cuenta.

2. VERSATILIDAD DE *S. aureus*: DE LA MICROBIOTA NORMAL AL OPORTUNISMO PATOGÉNICO

S. aureus es un microorganismo que se encuentra habitualmente formando parte de la microbiota normal de nariz, buco-faringe, tracto intestinal, piel y aparato genito-urinario en el ser humano, siendo la localización más frecuente la zona anterior de la mucosa nasal (Lozano et al., 2011). Habitualmente se encuentran en simbiosis con el ser humano sin causar enfermedad. La prevalencia de colonización por *S. aureus* varía considerablemente según el tipo de población y la localización del estudio, pero podemos realizar una distinción de la distribución de este microorganismo entre los individuos, diferenciando tres grupos que representan de forma estimada un tercio de la población cada uno: A) individuos no colonizados; B) individuos colonizados de forma intermitente; C) individuos colonizados de forma permanente (ISFHH., 2006; Gordon et al., 2008).

Pero *S. aureus* no sólo se encuentra en la microbiota normal, sino que también es considerado como uno de los patógenos oportunistas del ser humano más importantes del espectro bacteriano, atendiendo al abultado número de infecciones de diversa gravedad que es capaz de producir (Foster et al., 2009; van Belkum et al., 2009). El grupo de mayor riesgo

ante infecciones estafilocócicas está en aquellas personas debilitadas, ya sea por una enfermedad crónica o aquellas susceptibles de contraer infecciones secundarias por un estado de inmunodepresión. A menudo es detectado en infecciones piógenas, asociadas a enfermedades superficiales de tejido cutáneo y subcutáneo, pero también es capaz de provocar un amplio espectro de cuadros infecciosos y toxigénicos, así como estar implicado en importantes brotes o epidemias hospitalarias y/o comunitarias (**Tabla 1**). El mayor riesgo se produce en las infecciones de heridas o en lesiones de la piel que favorecen la penetración del microorganismo hasta otros tejidos, dependiendo del carácter invasivo de la cepa. En estos casos, las afecciones pueden llegar a derivar en patologías graves como neumonía, meningitis, abscesos, pericarditis, endocarditis o septicemias.

Tabla 1. Principales infecciones y enfermedades producidas por *S. aureus*

Infecciones primarias	Infecciones secundarias
Infecciones en la piel como: foliculitis, forúnculos, hidrosadenitis, impétigo, ampollas	Sepsis
Infecciones de catéteres intravenosos	Meningitis
Neumonía	Osteomielitis
Gastroenteritis	Artritis
Síndrome del Shock Tóxico (SST)	Endocarditis
Síndrome de la piel escaldada	Pericarditis

El carácter patogénico de *S. aureus* es conducido y/o modulado por una presencia variable de factores de virulencia, con los que puede contar para favorecer la colonización y la invasión celular, la degradación de células del sistema inmunitario y su evasión, la alteración de tejidos, así como su propia multiplicación. Aunque más adelante abordaremos en profundidad éste interesante aspecto de *S. aureus*, enumeraremos algunas de las propiedades generales que determinan el perfil virulento de éste microorganismo, entre las que se encuentran: componentes de la pared celular (cápsula mucoide polisacarídica, adhesinas, proteína A, ácidos teicoicos), enzimas (coagulasa, hialuronidasa, catalasa, termonucleasas) y diferentes toxinas (Gordon, 2008).

Además, *S. aureus* se relaciona de forma estrecha con diversas intoxicaciones alimentarias, pero en éste caso, no es la bacteria en sí misma la que causa la intoxicación, sino las toxinas que es capaz de producir durante su crecimiento en el alimento (Argudín et al., 2010). De lo que se puede deducir la importancia que *S. aureus* puede tener en la cadena alimentaria y es por ello, por lo que la industria agroalimentaria está dedicando sus esfuerzos en monitorizar los posibles portadores de esta bacteria con el fin de minimizar la transferencia

de *S. aureus* desde el manipulador de alimentos hasta el producto preparado para el consumo humano.

En cuanto a su ubicuidad fuera del entorno antropológico, cabe destacar que *S. aureus*, no es exclusivo del ser humano, y también se encuentra colonizando a animales, ya sea en su microbiota normal o causando infección. De hecho, en los últimos años, ha surgido especial interés en aquellas líneas genéticas que han sido relacionadas con animales, ya sean de forma libre o relacionados con su explotación. Su importancia reside en que son reservorios, donde *S. aureus* puede evolucionar adquiriendo nuevo material genético, modificando su perfil de virulencia y/o de resistencia a antimicrobianos. Finalmente, el animal puede servir como vector zoonótico para la transferencia de la bacteria al hombre, con las implicaciones en la salud humana que puede conllevar y, que, de hecho, ya son cuantificables y evidentes (Pantosi et al., 2012).

3. *S. aureus* Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS. RESISTENCIA A METICILINA. CONCEPTO SARM.

Los β-lactámicos constituyen el grupo más numeroso y diverso de antibióticos. Desde el descubrimiento de la bencilpenicilina en 1928 por Alexander Fleming, se han desarrollado multitud de derivados tanto naturales como sintéticos. Dentro de este grupo se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, y carbapenémicos. Todos estos antibióticos tienen en común que poseen un anillo β-lactámico, cuya estructura es similar al sustrato natural de las Proteínas de Unión a la Penicilina (Penicillin Binding Proteins, PBPs), lo que da lugar a una inhibición competitiva de las mismas (Nester et al. 2001). Esta inhibición altera la síntesis de la barrera del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, amenazando así la integridad estructural de la pared celular, especialmente para los microorganismos Gram positivos, como *S. aureus*. Es en el proceso final de la síntesis del peptidoglicano donde actúan estas sustancias impidiendo que tenga lugar la transpeptidación catalizada por las PBPs, también conocidas como transpeptidasas.

La razón de que ocurra esto se debe a que los β-lactámicos son análogos de la D-alanil-D-alanina, residuo terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera del peptidoglicano que está siendo sintetizado por *S. aureus*. La similitud estructural entre este dipéptido y los antibióticos β-lactámicos facilita su anclaje al sitio activo de las PBPs; así, el núcleo β-lactámico de la molécula se une irreversiblemente a la PBP evitando que tenga lugar la transpeptidación celular y por consiguiente la síntesis de la pared bacteriana. En 1944 se

introdujo la penicilina como tratamiento de las infecciones estafilocócicas, y tan sólo un año después empezaron a detectarse cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina. En la actualidad, más del 90% de las cepas de *S. aureus* presentan resistencia a penicilina por acción de las β-lactamasas, que se encuentran codificadas por el gen *blaZ,* presente en el genoma de *S. aureus*.

Debido a la aparición de estas enzimas, se buscaron nuevos antibióticos para combatir las infecciones producidas por *S. aureus*, como la meticilina, capaz de escapar de la acción de β-lactamasas. En 1961, dos años después de la introducción de este fármaco, aparecieron cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), capaces de sintetizar PBPs modificadas (PBP2a) que presentaban poca afinidad por los antibióticos β-lactámicos (Jevons et al., 1961). Desde entonces se ha observado una gran diseminación de éstas cepas en muchos hospitales, y actualmente SARM es considerado como el principal patógeno causante de infecciones nosocomiales en todo el mundo. La meticilina se administra de manera parenteral, ya que es inestable con el ácido gástrico. Por ello, surgieron diferentes derivados estables a nivel gástrico como la cloxacilina, la oxacilina o la flucoxacilina, lo que permitió un uso más generalizado. De todos ellos, la oxacilina es el antibiótico utilizado en el laboratorio para los test de sensibilidad debido a su mayor estabilidad.

El mecanismo de resistencia a meticilina fue descubierto en 1981 con la identificación de alteraciones en la afinidad de las PBPs para unirse al antibiótico (Hayes et al. 1981; Hartman et al. 1981). Las cepas de *Staphylococcus* se caracterizan por producir al menos 4 PBPs (PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4) que son inhibidas por los β-lactámicos, incluida la meticilina. Sin embargo, las cepas SARM producen una nueva PBP con baja afinidad por los antibióticos β-lactámicos, conocida como PBP2a o PBP2'. Esto permite que cuando las PBPs 1, 2, 3 y 4 están inhibidas por el antibiótico, la PBP2a sea capaz de mantener la síntesis del peptidoglicano. La PBP2a está codificada en el gen *mecA,* el cual se encuentra dentro de un casete cromosómico estafilocócico denominado *SCCmec,* lo que permite la diseminación de este mecanismo de resistencia. La gran importancia biomédica de SARM reside en que, el gen *mecA*, además de conferirle resistencia a meticilina, también lo hace para la mayoría de antibióticos β-lactámicos, y a menudo, se asocia con fenotipos de multirresistencia a otras familias de antibióticos, como veremos más adelante.

En resumen, los principales mecanismos de resistencia de *S. aureus* a β-lactámicos son:

- ✓ Producción de β-lactamasas que actúan sobre las penicilinas naturales o semisintéticas. La resistencia a penicilina está mediada por el gen *bla*Z que codifica una β-lactamasa (penicilanasa) con el control del antirepresor BlaR1 y el represor BlaI. En presencia de penicilina, se estimula una autofragmentación de BlaR1 que degrada secuencialmente a BlaI y permite así la expresión del gen *bla*Z, cuyo producto hidroliza a la penicilina para producir ácido peniciloico inactivo. (**Figura 3**)
- ✓ Síntesis de PBPs modificadas como PBP2a, de baja afinidad para los β-lactámicos. Estas proteínas están codificadas por el gen *mecA* o *mecC*.

4. *S. aureus* Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS NO β-LACTÁMICOS. CONCEPTO DE MULTIRRESISTENCIA.

S. aureus además de desarrollar una gran maquinaria de resistencia ante antibióticos β-lactámicos (penicilina, meticilina), puede adaptarse a la presión selectiva de otras familias de antibióticos, desarrollando múltiples mecanismos de resistencia mediante la modificación de estructuras bacterianas o rutas metabólicas. De hecho, la resistencia a meticilina en el SARM es de gran interés clínico ya que suele ir asociada a múltiples resistencias a otros antimicrobianos no β-lactámicos. Se considera que SARM es multirresistente cuando además de a los β-lactámicos, presenta resistencia, al menos, a otras tres familias de antibióticos. Para ello *S. aureus* es capaz de sufrir mutaciones en su genoma y/o adquirir diferentes mecanismos de resistencia através de la captación de genes de otras especies o géneros que le conferirán diferentes funciones (**Figura 3**):

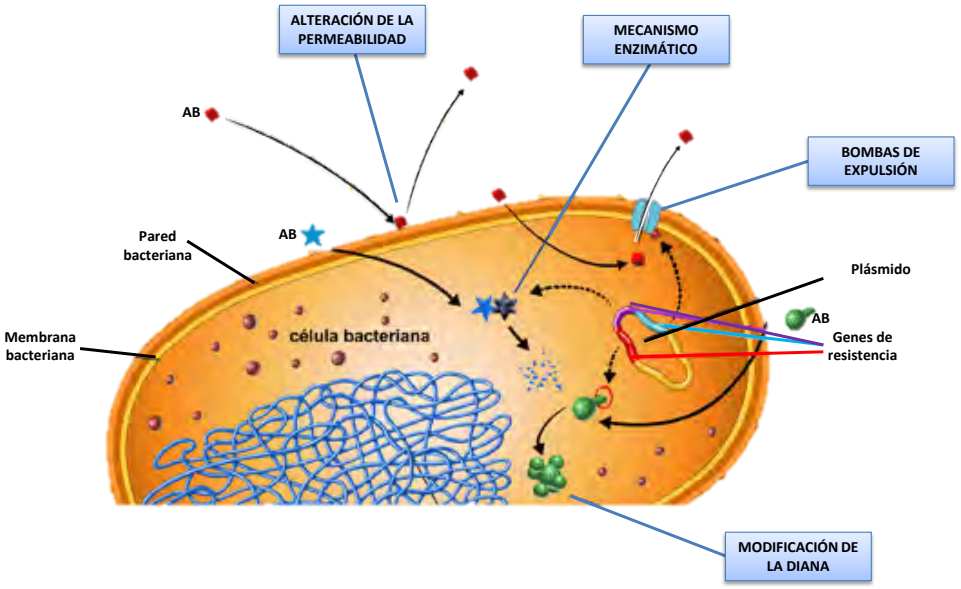


Figura 3. Esquema de los principales mecanismos de resistencia asociados a *S. aureus*

- ✓ Alteración de la permeabilidad de las membranas o de la pared celular
- ✓ Expulsión activa del antibiótico al exterior de la bacteria
- ✓ Modificación o protección de la diana
- ✓ Inhibición o inactivación enzimática del antibiótico

A continuación repasamos las principales familias de antibióticos, las dianas específicas dentro de *S. aureus* y los mecanismos de resistencia que este microorganismo puede adquirir para evadir su acción.

Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS)

Estos tres grupos de antibióticos, aunque se diferencian en su estructura química, comparten mecanismos de acción y resistencia. Entre ellos se encuentran la eritromicina, clindamicina y lincosamina. Fundamentalmente tienen una diana común como mecanismo de acción principal, ya que afectan a la síntesis proteica a diferentes niveles de la translocación peptídica, inhibiendo la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano, sobre todo en Gram positivas donde se han descrito diversos mecanismos de resistencia:

- ✓ Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas principalmente por genes *erm*, y en raras ocasiones por el gen *cfr*, o por mutaciones en el ARNr 23S y/o en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22.
- ✓ Inactivación del antibiótico gracias a la acción de enzimas codificadas por los genes *lnu*(A), *lnu*(B), *lnu*(C), *vat*, *vgb* y *mph*(C).
- ✓ Expulsión activa del antibiótico relacionado con diferentes genes como *msr*(A)/*msr*(B), *mef*(A), *mef*(E), *erp*(B), *vga*(A), *vga*(B), *vga*(C), *vga*(D), *vga*(E), *lsa*(A), *lsa*(B), *lsa*(C), *lsa*(E).

Se han encontrado diferentes fenotipos de resistencia en función de los antibióticos que se ven afectados. El más común es el denominado MLS_B que consiste en resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B y se debe a la presencia de genes *erm*. Los genes *erm*(A) y *erm*(C) son los más frecuentemente encontrados en *S. aureus*. Algunos estudios previos han constatado que *erm*(A) suele encontrarse con más frecuencia en aislados SARM, mientras que el gen *erm*(C) parece detectarse más habitualmente en *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM) (Schmitz et al., 2000),aunque con algunas excepciones (Spiliopoulou et al., 2004).Otros genes *erm* que también se han detectado en este género son *erm*(B), *erm*(T), *erm*(Y) y *erm*(TR). El fenotipo MLS_B puede expresarse de forma constitutiva o inducible, siendo la eritromicina el antibiótico que induce la expresión del mecanismo de resistencia. Otro fenotipo de resistencia es el MS que da lugar a resistencia a macrólidos de 14

y 15 átomos y estreptograminas del grupo B, y no a macrólidos de 16 átomos ni a lincosamidas. En *S. aureus* este fenotipo se suele deber a la presencia de los genes *msr*(A) y *msr*(B).

Otros fenotipos de resistencia poco habituales son L, LSA, SA, SB consistentes en resistencia a lincosamidas, lincosamidas y estretograminas A, estreptograminas A y estreptograminas B, respectivamente. Estos fenotipos se deben a la presencia de genes tales como *lnu*(A), *vga*(A), *vga*(C), *vga*(E), *lsa*(B) o *cfr*. Algunos de estos genes se han asociado en los últimos años a cepas SARM de origen animal (Kadlec et al., 2010a; Smith et al., 2008, Lozano et al., 2012). Cabe destacar el gen *cfr*, ya que se asocia a multirresistencias combinadas a lincosaminas, estreptograminas, fenicoles, pleuromutilinas y oxazolidinonas. El gen *cfr* codifica una metiltransferasa que actúa en la posición A2503 del ARNr 23S (Kehrenberg et al., 2006).

Aminoglucósidos

Dentro de esta familia de antibióticos encontramos a la kanamicina, tobramicina, gentamicina y estreptomicina. Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis proteica, y se unen de manera irreversible a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. Por ello, interfieren en la elongación de la cadena peptídica y pueden inducir una traducción equivocada del ARNm lo que causa una incorporación errónea de aminoácidos dando lugar a la síntesis de proteínas anómalas y no funcionales. Los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos incluyen defectos en la entrada del aminoglucósido al interior de la célula bacteriana, alteraciones en el ribosoma y modificación enzimática del antibiótico con pérdida de su afinidad por el ribosoma. En *S. aureus,* la resistencia a estos antibióticos se produce principalmente por la acción de enzimas codificadas por los genes *aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia* (enzima bifuncional que confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, y kanamicina), *ant*(4')-Ia (confiere resistencia a tobramicina y kanamicina), *aph*(3')-IIIa (confiere resistencia a kanamicina) y *ant*(6)-Ia (confiere resistencia a estreptomicina).

Tetraciclinas

Este tipo de antibióticos también actúan inhibiendo la síntesis proteica por unión a la subunidad 30S del ribosoma. Se conocen dos mecanismos fundamentales desarrollados por *S. aureus* y codificados en varios genes de resistencia. Los genes *tet*(K) y *tet*(L) favorecen la expulsión activa del antibiótico, mientras que los genes *tet*(M) y *tet*(O) codifican una modificación de la diana mediante la protección del ribosoma. La resistencia a tetraciclina puede ser utilizada en cepas SARM como un marcador de líneas genéticas asociadas a animales (Lozano *et al*., 2012b). En *S. aureus* se encuentra con mayor frecuencia el gen *tet*(K)

confiriendo resistencia solo a la tetraciclina, mientras que el gen *tet*(M) puede conferir resistencia a doxicilina y minociclina, en adición a tetraciclina (Schmitz *et al*., 2001).

Fenicoles

En este caso, el cloranfenicol, antibiótico más representativo del grupo, actúa a nivel de la subunidad 50S del ribosoma, inhibiendo la actividad de la enzima peptidil transferasa, por lo que se bloquea la síntesis de proteínas. Se consideran formas de resistencia a estos antibióticos aquellos mecanismos que modifican la diana (mediante enzimas) o mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana. Los mecanismos más comúnmente detectados en *Staphylococcus* spp. son los mediados por los genes $cat_{pc221,}$ cat_{pc223}, cat_{ps194}, y en menor medida por los genes *cfr* y *fexA* (Kehrenberg *et al*., 2006; Schnellmann *et al*., 2006).

Oxazolidinonas

El antimicrobiano más representativo de ésta familia es el linezolid. Su uso está dirigido al tratamiento de infecciones severas ocasionadas por patógenos que son resistentes o multirresistentes a otras familias de antibióticos y que son difíciles de tratar, incluyendo SARM. El mecanismo de acción del linezolid también se centra en la inhibición de la síntesis de proteínas, pero en este caso, a través de la unión de N-formilmetionil al ARNt de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Desde su comercialización a principios del siglo XXI, tan sólo algunas especies de SCN y algunos enterococos han desarrollado mecanismos de resistencia a dicho antibiótico (Meka et al., 2004; Gómez-Gil et al., 2009; Bender et al., 2015). Las bases moleculares de estas incipientes resistencias se localizan a nivel de mutaciones en la diana (ARNr 23S: G2576U, G2447U, and U2504A) (Tewhey et al., 2014), mutaciones en las proteínas ribosómicas L_3, L_4 ó L_{22} (Mendes et al., 2010), así como la adquisición de genes como *cfr* (Kehrenberg *et al*., 2006, Bender et al., 2015).

Glucopéptidos

La vancomicina es el máximo exponente de este grupo de antibióticos, mayoritariamente utilizado para el tratamiento de infecciones causadas por cepas *S. aureus* y otras especies SCN. Su utilización es frecuente en endocarditis producidas por varios agentes etiológicos, como el SARM, y se requiere un estricto control de los niveles séricos debido a su nefrotoxicidad (Chan et al., 2015). Estos antibióticos inhiben el proceso de transglicosilación en la formación de la pared celular bacteriana uniéndose a las moléculas precursoras (N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina) que formarán las unidades estructurales de la pared de peptidoglicano (Reynolds et al., 1989). A diferencia de los β-lactámicos que actúan sobre las

enzimas encargadas de la síntesis de este componente de la pared celular, la vancomicina actúa a nivel de sus precursores. No obstante, ya han comenzado a aparecer diversos mecanismos de resistencia que permite a SARM evadir su acción, ya sea de una forma intermedia con un bajo nivel de resistencia (mediado por un engrosamiento de la pared celular y un aumento de la expresión de PBP2a), o de una forma más específica (mediante la adquisición del gen *vanA*) que le confiere mayor nivel de resistencia (Appelbaum et al., 2006; Chan et al., 2015).

Mupirocina

Es considerado como el antibiótico tópico de elección para la descolonización por *S. aureus*. Recordemos que *S. aureus* forma parte de la microbiota normal de humanos, pero dado su carácter patogénico oportunista, puede requerirse su erradicación en ámbitos de alto riesgo, como el hospitalario (Doebling et al., 1993; Anderson et al., 2015). La mupirocina actúa a nivel de la síntesis proteica bacteriana, inhibiéndola mediante su unión a la enzima isoleucil-ARNt sintetasa. De esta forma impide la incorporación del aminoácido isoleucina a la cadena peptídica (Morton et al., 1995). Sin embargo, su uso y abuso está llevando a la emergencia de diferentes mecanismos de resistencia, ya sea por mutación del gen codificante de la enzima isoleucil-ARNt-sintetasa (*ileS*), que le confiere resistencia de bajo nivel; o por adquisición de genes de resistencia específicos como *mupA* y/o *mupB* (*ileS2*) que codifican variantes funcionales de esta enzima que carece de afinidad por mupirocina y le confiere a la bacteria resistencia de alto nivel (Cookson et al., 1998; Udo et al., 2003; Seah et al., 2012).

Fusidanos

El ácido fusídico es un potente agente bacteriostático cuya acción se basa en la unión al factor de elongación G (FE-G), impidiendo la liberación del ribosoma durante la síntesis proteica bacteriana. Los mecanismos de resistencia de *S. aureus* frente el ácido fusídico pueden estar mediados por mutaciones en el gen *fusA*, codificante de este factor de elongación (FE-G) o mediante la adquisición del gen *fusB*, codificante de una proteína que se une al FE-G y lo protege de la acción del antibiótico (Chen et al., 2010). Recientemente han sido descritos los genes *fusC* y *fusD*, nuevos determinantes de resistencia frente a este antimicrobiano (McLaws et al., 2011)

Diaminopirimidinas

El trimetoprim es otro agente bacteriostático caracterizado por inhibir la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Dada su importancia en la síntesis de precursores de bases nitrogenadas, su inhibición paraliza la síntesis de ADN en la bacteria. *S. aureus* dispone

de una amplia batería de mecanismos de resistencia a este antibiótico, entre las que se encuentran la expulsión directa por eflujo o permeabilidad reducida, la mutación en los genes codificantes de la DHFR (*dfr*), así como la producción de enzimas DHFR adicionales o sobreproducción de enzimas DHFR (Huovinen, 2001), codificados en los genes *dfrA*, *dfrD*, *dfrG* y *dfrK* (Kadlec et al., 2009a; Kadlec et al., 2010b).

Quinolonas

Es un grupo de antimicrobianos sintéticos, entre los que destacamos el ácido nalidixico y el ciprofloxacino. Las quinolonas actúan sobre las enzimas ADN-girasa cromosómica y ADN-topoisomerasa IV, inactivándolas. De esta forma, inhiben la multiplicación bacteriana y la replicación del ADN. *S. aureus* desarrolla resistencias a estos antimicrobianos mediante mutaciones en las subunidades que conforman la ADN topoisomerasa IV (GrlA y GrlB) o la ADN girasa (GyrA y GyrB), así como mediante la mutación del gen *norA* que altera la difusión de las quinolonas a la bacteria mediante bombas de eflujo (Zou et al., 2014). Los cambios aminoacídicos que con frecuencia se asocian a resistencias en fluoroquinolonas en *S. aureus* son Ser80Phe (GrlA) o Ser84Leu (GyrA).

En la **figura 4** se resumen los principales antimicrobianos citados anteriormente, así como sus principales dianas de acción en la célula bacteriana:

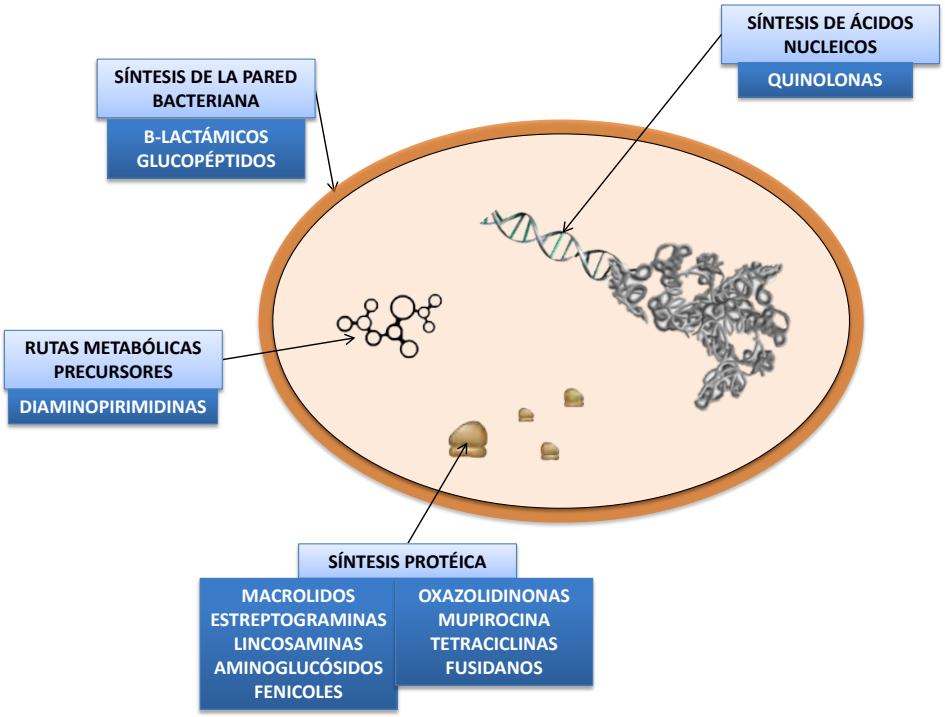


Figura 4. Dianas de los agentes antimicrobianos en *S. aureus*

5. PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA EN *S. aureus*

La patogenia de *S. aureus* depende fundamentalmente de los determinantes de virulencia que contenga en su genoma y de su capacidad para expresarlos, tanto cuando actúa como colonizador o como agente infeccioso. A continuación se resumen las más importantes (**Tabla 2**):

Citotoxina: Leucocidina de Panton-Valentine (LPV)

Descubierta en 1932 por Panton y Valentine (Panton et al., 1932), se trata de una toxina sinergohimenotrófica formada por dos subunidades proteicas codificadas en dos genes, *lukS*-PV y *lukF*-PV; estas proteínas actúan de manera sinérgica tras su expresión independiente y co-ensamblaje posterior (Prevost et al., 1995). Aunque se estima que tan sólo se encuentra en un 2-4% de las cepas de *S. aureus*, se trata de la toxina más importante que este microorganismo es capaz de producir debido a su potencial patogénico basado en la destrucción leucocitaria, hemolisis y en la necrosis tisular (Okolie et al., 2013). Su acción se asocia principalmente a afecciones cutáneas y subcutáneas severas o a neumonías necrotizantes letales y con mucha menor incidencia a enfermedades invasivas tales como septicemias o endocarditis (Lina et al., 1999; Gillet el al., 2002; Balachandra et al., 2015).

Citotoxinas: Leucocidinas DE y M

Asimismo, *S. aureus* es capaz de producir otros determinantes de virulencia de la familia de las citotoxinas y aunque son de menor importancia clínica que la anterior, también debemos hacer una consideración especial a ellas. En el caso de la leucocidina DE, está formada por dos subunidades proteicas codificadas en los genes *lukD* y *lukE*. Produce también dermonecrosis, testada en un modelo animal de conejo, aunque tiene una baja actividad leucotóxica y carece de actividad hemolítica (Gravet et al., 1998; Gravet et al., 1999; Kaneco et al., 2004). Por otro lado, la leucocidina M, formada por dos subunidades codificadas en los genes *lukM* y *lukF-PV*, se ha asociado a la destrucción de leucocitos polimorfonucleares en rumiantes, con especial actividad sobre neutrófilos bovinos, siendo considerada una toxina clave en el desarrollo de mastitis del ganado ovino y bovino (Kaneco et al., 2004; Barrio et al., 2006; Schlotter et al., 2012).

Citotoxinas hemolíticas

Se trata de un grupo de toxinas, que de forma general, se encuentran en la mayor parte de aislados de *S. aureus*, en parte por su localización en una región muy estable del núcleo cromosómico estafilocócico (Kaneco et al., 2004). Hasta la fecha se han descrito cinco hemolisinas: alfa (α-hemolisina, codificada por el gen *hla*), beta (β-hemolisina, *hlb*), delta (δ-hemolisina, *hld*), gamma (γ-hemolisina, *hlg*) y gamma variante (γ_v-hemolisina, *hlgv* o *hlg-2*). La más estudiada de ellas es la α-hemolisina, asociada con una alta actividad dermonecrótica y neurotóxica (Dinges et al., 2000), siendo letal para una amplia variedad de células eucariotas presentes en un amplio rango de animales. La susceptibilidad a esta toxina depende en gran medida de la especie animal (las células de conejo son 1000 veces más sensibles que las humanas) y del tipo de célula afectada (son más susceptibles los eritrocitos que los fibroblastos) (Menestrina et al., 2003; Murray et al., 2009). Sin embargo, todavía se desconocen los mecanismos exactos por los que puede causar enfermedad en el ser humano, así como la intensidad de la afección. En el caso de la β-hemolisina, destaca por codificar esfingomielinasa y tener un alto nivel de expresión de la misma, por lo que tiene alto poder patogénico ante una gran variedad de células (eritrocitos, leucocitos, fibroblastos o macrófagos) (Dinges et al., 2000; Murray et al., 2009). Asimismo, el locus en el que está situado el gen *hlb* puede sufrir ciertas modificaciones por la adición de nuevo material genético vehiculizado por fagos, aportando nuevas capacidades de virulencia o colonización a *S. aureus,* como veremos más adelante (van Wamel et al., 2006). La δ-hemolisina actúa alterando las membranas celulares. Tiene un amplio espectro de actividad citolítica, afectando tanto a eritrocitos como a otras estructuras subcelulares (protoplastos, lisosomas, etc) (Verdon et al., 2009). También se caracteriza por su actividad dermonecrótica, pero con menor intensidad que la que produce la α-hemolisina (Gordon et al., 2008). Por último, la γ-hemolisina también es capaz de lisar células sanguíneas de la serie roja, además destaca por estar constituida por dos subunidades, de manera muy similar a LPV (Dinges et al., 2000; Kaneko et al., 2004).

Toxinas exfoliativas

Existen tres toxinas exfoliativas que han sido asociadas directamente con patologías humanas, EtA (codificada por el gen *eta*), EtB (gen *etb*) y EtD (gen *etd*) (Yamaguchi et al., 2002). Las exfoliatinas son, básicamente, proteasas que se encargan de romper los enlaces peptídicos que se forman en los dominios extracelulares de la desmogleína 1, lo que provoca una desestabilización a nivel de los desmosomas que son los que mantienen unidos a las células

epiteliales (Nishifuji et al., 2008). Estas toxinas son responsables de producir el síndrome de la piel escaldada estafilocócica, enfermedad que se caracteriza por la deshidratación y pérdida progresiva de estratos epidérmicos que puede llevar a infecciones oportunistas por parte de otros microorganismos. Esta patología suele encontrarse fundamentalmente en pacientes pediátricos.

Asimismo, se han descrito otro tipo de exfoliatinas, la EtC (gen *etc*) y la EtD2 (gen *etD2*), pero en ambos casos han sido relacionadas originariamente con patología en animales. No obstante, la exfoliatina EtD2 forma parte del genoma característico de una nueva línea genética que está emergiendo actualmente como un grave problema zoonótico por su transmisión al hombre, como ampliaremos más adelante.

Toxinas Pirogénicas Superantígeno (PTSAg)

Entre este tipo de toxinas exocelulares encontramos a la Toxina del Síndrome del Shock Tóxico (TSST) y a 18 enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU). Este grupo de toxinas comparten muchas características bioquímicas y mecanismos patogénicos. Tienen la capacidad de estimular un gran número de células T en el hospedador, produciendo un aumento en el nivel de expresión de citoquinas celulares que resultan muy tóxicas (Fraser et al., 2008; Ortega et al., 2010).

La TSST (codificada por el gen *tsst-1*) debe su nombre por ser el agente causal del Síndrome del Shock Tóxico (SST), que se caracteriza por un cuadro clínico en el que se incluyen dolor de cabeza, fiebre elevada, desorientación, vómitos, diarrea y, en ocasiones, erupciones cutáneas. Se describió por primera vez en pacientes pediátricos o adolescentes (Todd et al., 1978), especialmente asociado al uso de tampones en mujeres jóvenes, en las cuales se producía una colonización intravaginal por cepas de *S. aureus* productoras de esta toxina (Torres *et al*., 2001). También se han descrito variantes de TSST bovinas y ovinas, aunque rara vez afectan a humanos (Lee *et al*., 1992).

Hasta la fecha se han descrito 18 enterotoxinas estafilocócicas (SEs), además de algunas variantes de SEC, SEG, SEH, SEI y SEU. Este amplio grupo de toxinas son responsables de la mayoría de toxoinfecciones alimentarias por *S. aureus*, ya que son altamente termoestables y resistentes a las principales enzimas defensivas presentes en nuestro tracto digestivo. Además, se han descrito como agentes causales o exacerbantes de enfermedades como artritis, dermatitis atópica, síndrome del intestino irritable o enfermedad de Kawasaki, entre otras (Thomas et al., 2007; Larkin et al., 2009). Las enterotoxinas tienden a concentrarse en grupos genómicos (enterotoxin gene cluster –*egc*- en inglés) y hasta la fecha se han descrito

dos de estos grupos denominados *egc* cluster (incluyendo los genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* y *seo*) y *egc* like cluster (que incluye además de los anteriores, el gen *seu*) (Jarraud et al., 2001; Argudín et al., 2010).

Tabla 2. Clasificación de las toxinas detectadas en *S. aureus* en función del cuadro clínico

Cuadro Clínico	Factor de virulencia	Función	Genes
Alteraciones cutáneas invasivas, pulmonía necrotizante y destrucción de tejidos y células	Leucocidinas (LPV, DE y M)	Alteración de la permeabilidad celular, destrucción leucocitaria	*lukS-PV/lukF-PV, luk-DE y luk-M*
	Hemolisinas	Ruptura de membranas celulares	*hla, hlb, hld, hlg, hlgv*
Síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada estafilocócica, intoxicación alimentaria y sepsis	Toxina TSST	SST	*tsst-1*
	Toxinas exfoliativas	Epidermolisis	*eta, etb, etd, etD2*
	Enterotoxinas	Toxoinfección alimentaria	*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser, seu*

6. CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN, ADHESIÓN, INVASIÓN Y EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE HUMANO POR *S. aureus*.

Además de todos los factores de virulencia citados anteriormente, *S. aureus* dispone de otra batería de genes cuya expresión facilita, además de un aumento de la patogenia, su adhesión a diferentes superficies celulares, así como la evasión a diferentes componentes del sistema inmune humano, lo que es clave para una colonización exitosa del microorganismo en el ser humano (van Wamel et al., 2006; Gordon et al., 2008; Grumman et al., 2013) (**Figura 5**).

Enzimas específicas

Es destacable la presencia de algunas enzimas que al ser excretadas por *S. aureus*, facilitan la colonización al ser humano y su invasión a otros tejidos. Por ejemplo la coagulasa, es una enzima codificada por el gen *coa* y que es importante en la formación de abscesos y le confiere a *S. aureus* protección frente a la fagocitosis. Por otro lado tenemos la catalasa, enzima codificada por el gen *kat* que le confiere a *S. aureus* protección frente a la fagocitosis. La termonucleasa es otra enzima que está codificada por el gen *nuc*. Permite a *S. aureus* la degradación de ácidos nucleicos. En el caso de esta enzima, su importancia también va a recaer en su utilización como marcador especie-específico para *S. aureus*, como veremos más adelante. Este microorganismo también dispone de otras enzimas como la hialuronidasa, que

degrada el ácido hialurónico y favorece la invasión de *S. aureus* a otros tejidos, o la lipasa, que hace lo propio con el tejido graso, facilitando su invasión a tejidos sebáceos.

MSCRAMMs (Microbial Surface components recognizing adhesive matrix molecules)

Son componentes de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz celular mediando la adherencia a los tejidos por parte de *S. aureus* (Clarke et al., 2006; Witte et al., 2007). Las MSCRAMMs se unen a moléculas como el colágeno (factor Cna, codificado por el gen *cna*), fibronectina (FnBPA, FnBPB), fibrinógeno (ClfA, ClfB), o elastina (EbpS). La proteína Eap, además, contribuye a la formación de biofilms y participa en la inhibición del reclutamiento de neutrófilos. La proteína A (SpA, staphylococcal protein A) bloquea la fracción Fc de las inmunoglobulinas inhibiendo la fagocitosis, se une al factor von Willebrand (Vwm) para inhibir la adhesión plaquetaria; participa en la proinflamación y actúa como superantígeno de los linfocitos B.

Producción de Biofilm

Aunque la formación de biofilm se considera un determinante de virulencia, también contribuye a la supervivencia y diseminación bacteriana en el hospedador. Se caracteriza por formar comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, permitiendo a la bacteria sobrevivir bajo condiciones de estrés. Éstos aumentan el riesgo de complicaciones en los individuos afectados e incrementa los costes de atención y tratamiento. Su producción se debe a la presencia del operón *ica* (intracelular adhesión cluster), compuesto de varios genes (*icaR*, *icaADBC*) implicados en la biosíntesis del polisacárido de adherencia intercelular (PIA), que constituye el principal componente de la matriz del biofilm (Ziebhur et al., 1999). Existen otras proteínas que influyen en la formación del biofilm, entre las que destaca la proteína de superficie Bap (biofilm-associated protein), involucrada en la adherencia a superficies inertes y en incrementar la infección (Cucarella et al., 2001).

CLÚSTER DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE HUMANO (IEC)

Se ha descrito en *S. aureus* la presencia de una agrupación de genes que le sirve a la bacteria para sobrevivir en el ser humano en los primeros estadios de colonización y/o infección mediante la capacidad de evasión del sistema inmune innato humano. Se le conoce como IEC (del inglés Immune Evasion Cluster) y puede estar formado por hasta cinco genes: *scn*, *chp*, *sak*, *sea* y *sep*. Estos genes pueden ser transferidos a *S. aureus* por medio de

bacteriófagos de la familia 3 (ϕ3), o también conocidos como fagos convertidores de la hemolisina β (βC-ϕs). Estos bacteriófagos son capaces de transducir los genes citados anteriormente en la región conservada 3´ terminal del gen codificante de la β-hemolisina (*hlb*), insertándolos en diversos puntos del gen y modificando así su estructura inicial. De tal forma que los distintos genes del IEC quedarán integrados en una región de unos 8 kb dentro del gen de la β-hemolisina, el cual podrá quedar parcialmente truncado a efectos de expresión (van Wamel et al., 2006). La presencia de diferentes combinaciones de éstos genes en *S. aureus* nos permite clasificar los diferentes aislados en 7 variantes de IEC (A, B, C, D, E, F, G).

Las bases bioquímicas mediante las cuales *S. aureus* escapa a los diferentes mecanismos de defensa del ser humano se basan en la inactivación y/o inhibición de algunos de los moduladores del sistema inmune innato humano (**Figura 5**). El componente más importante y que es imprescindible para la consideración de la presencia de IEC es SCIN (inhibidor del complemento estafilocócico) que está codificado por el gen *scn.* Se trata de un inhibidor del sistema del complemento, que bloquea la conversión de la molécula C3 a C3b en la superficie de *S. aureus*. Por lo que la bacteria no será marcada y así podrá escapar de la acción fagocítica de los neutrófilos humanos. Asímismo, la nula o baja producción de moléculas C3b sobre la superficie antigénica de *S. aureus,* repercute a su vez en bajas concentraciones de moléculas del sistema del complemento mediadoras de la inflamación, como C5a, evitando que acudan al foco infeccioso por el torrente sanguíneo, lo que implica que no se produzca la respuesta inflamatoria de manera normal y por ello, que el número de macrófagos que acuden a la infección se reduzca considerablemente permitiendo a *S. aureus* escapar de la opsonización y posterior fagocitosis (Rooijakers et al., 2005; Rooijakers et al., 2007).

Por otro lado, el IEC puede contener las llamadas proteínas CHIPS (proteínas inhibidoras de la quimiotaxis), codificadas por el gen *chp*. La función de estas exoproteínas está asociada y puede ser sinérgica a la función de SCIN. Caso de no producirse correctamente la inhibición del sistema del complemento mediante la inhibición del marcaje de la bacteria a través de C3b y C5a (acción SCIN), las proteínas CHIPS se unirán a los receptores específicos de éstas moléculas opsonizadoras quimiotáxicas (C3bR, C5aR), lo que implicará que se produzca una disminución de la respuesta inflamatoria y por tanto una disminución de la migración de monocitos y neutrófilos al foco infeccioso. De esta manera, *S. aureus* podría escapar de nuevo a las primeras defensas no específicas de la maquinaria del sistema inmune humano (Postma et al., 2004).

En la misma línea que lo anterior, el gen *sak* codifica una estafiloquinasa (SAK) cuyo fundamento bioquímico nos vuelve a llevar al concepto de anti-opsonización. En este caso se realiza de una manera indirecta ya que mediante la activación y conversión del plasminógeno humano a plasmina en la superficie de *S. aureus,* se favorece la inactivación de las opsoninas C3b o inmunoglobulinas G (IgG) (Rooijakers et al., 2005). Además, otros estudios han demostrado su importancia como bloqueador de las α-defensinas. La unión de la estafiloquinasa a éstas moléculas inactiva la función lítica que tienen estas enzimas sobre las membranas de los microorganismos (Jin et al., 2004).

Por último, otro de los componentes que pueden estar integrados en el clúster IEC son las enterotoxinas SEA (codificadas por el gen *sea*) y SEP (gen *sep*). Estudios previos han sugerido que su función moduladora de receptores relacionados con la cascada del complemento, podría tener un efecto sinérgico con los demás mecanismos de evasión del sistema inmune humano citados anteriormente (Rahimpour et al., 1999).

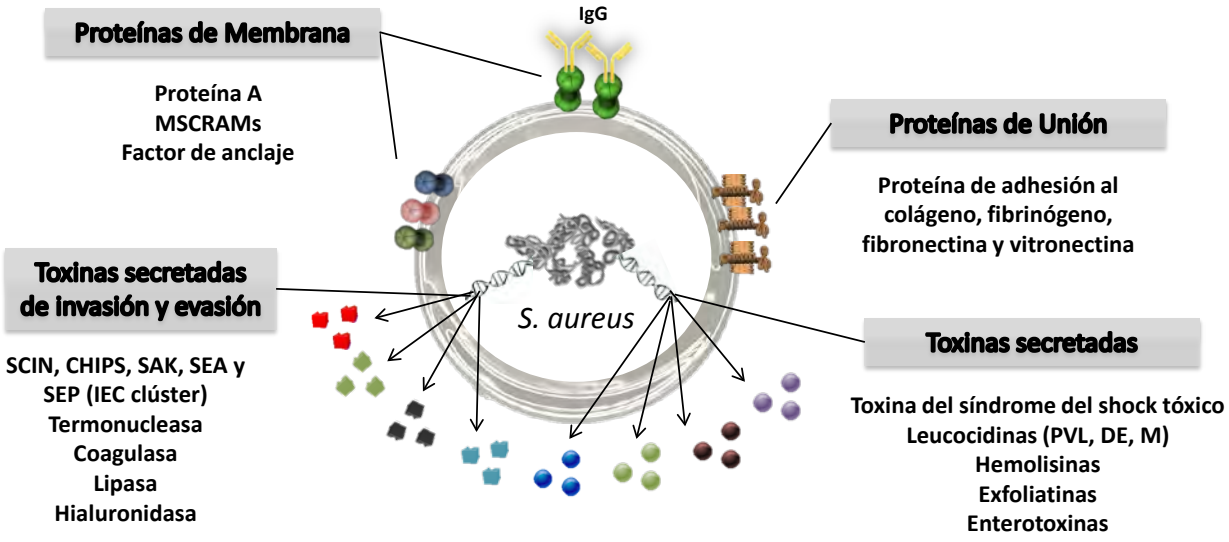


Figura 5. Principales factores de virulencia, factores de adhesión y colonización y mecanismos de evasión del sistema inmune humano en *S. aureus*

7. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus* Y SARM MEDIANTE TIPADO MOLECULAR

En los últimos años se han ido desarrollando diversas técnicas de biología molecular con el fin de alcanzar dos objetivos fundamentales del denominado "tipado molecular":

- ✓ Reconocer la relación entre aislados vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común.
- ✓ Diferenciar aislados no relacionados, con independencia de su pertenencia a la misma especie microbiológica o taxón.

Con el fin de entender la epidemiología de *S. aureus* y SARM, conocer los clones o líneas genéticas predominantes en brotes e infecciones tanto en el ámbito hospitalario como comunitario, así como conocer las variantes asociadas a determinados ambientes y especies animales, y su especificidad y transmisibilidad, se han desarrollado una amplia gama de técnicas para llevar a cabo el tipado molecular de cada aislado. La mayor ventaja de las técnicas de tipificación basadas en el estudio y manipulación del ADN radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos transversal y universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos (Domínguez et al., 2005). A continuación se explican brevemente los fundamentos de los métodos moleculares de tipificación de *S. aureus* que se han utilizado en esta tesis doctoral.

7.1. Tipado del cassette cromosómico SCC*mec*

Se trata de una técnica que se basa en el análisis del polimorfismo del cassette SCC*mec*. Esta gran estructura genética, contiene, entre otras cosas, los genes que codifican la resistencia a meticilina, ya sea *mecA* o *mecC*. Los principales elementos de esta superestructura, así como sus funciones se describen a continuación.

Como veíamos en anteriores epígrafes, uno de los genes responsables de conferir resistencia a meticilina es el gen *mecA*. La expresión de este gen en la proteína PBP2a, está regulado por otros dos genes situados en la misma línea de transcripción: *mecI y mecRI*. El primero codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA,* mientras que el segundo actúa como regulador de la señal de transducción de dicho gen. Para que el gen *mecA* se transcriba, el β-lactámico debe unirse al dominio receptor codificado por el *mecRI*, esto induce a la proteasa autocatalítica a unirse a *mecI* con lo que el operador del *mecA* queda libre expresándose la proteína PBP2a (Zhang *et al., 2001*). Aunque el origen del gen *mecA* no está del todo claro, se cree que proviene de la especie *Staphylococcus sciuri* (Wu et al., 2001). Podríamos definir la localización del gen *mecA* como un elemento que forma parte de una isla genómica conocida como SCC*mec* que se encuentra integrada en el cromosoma de *S. aureus*. No se conoce con exactitud el mecanismo de adquisición del mismo, pero existen dos genes, *ccrA* y *ccrB*, presentes en el elemento SCC*mec*, que codifican recombinasas capaces de escindir e integrar dicho elemento en el cromosoma. Pero en la isla genómica del SCC*mec* no sólo aparecen éstas recombinasas, sino también elementos o secuencias de inserción como son el IS431 y el IS1272 (**Figura 6**).

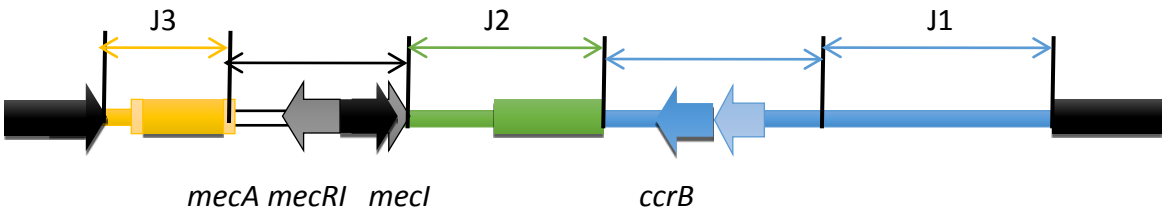


Figura 6. Representación de las partes que conforman el SCC*mec*: compejo *mec, ccr y* regiones *J*

Al conjunto del gen *mecA*, sus genes reguladores (*mecI* y *mecRI*) y las secuencias de inserción IS431 y IS1272 se le conoce como complejo *mec*. Actualmente se han definido diferentes clases del complejo *mec* (**Figura 7**).

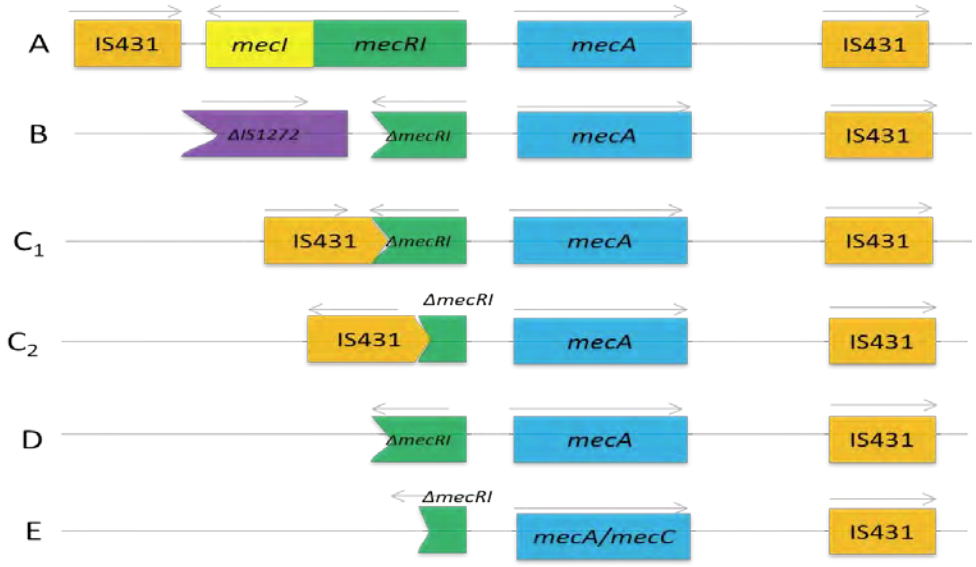


Figura 7. Clases del complejo *mec* de *S. aureus* (Basado en Deurenberg et al., 2008, Shore et al., 2011)

En base a las diferentes combinaciones y características que presenten éstos elementos en las islas genómicas del complejo *mec*, así como los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones (Ito et al., 2001), podemos clasificar el cassette cromosómico más importante de *S. aureus* en diferentes tipos de SCC*mec*. De momento se conocen con exactitud 11 tipos de SCC*mec* y diferentes subtipos clasificados en función de las secuencias Junkyard (regiones J) (Hiramatsu et al., 2013; www.sccmec.org) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Tipos de SCC*mec* de *S. aureus* y combinación de constituyentes

Tipo SCC*mec*	Tipo *ccr*	Complejo *mec*
I	1 (*ccrA1ccrB1*)	B
II	2 (*ccrA2ccrB2*)	A
III	3 (*ccrA3ccrB3*)	A
IV	2 (*ccrA2ccrB2*)	B
V	5 (*ccrC*)	C2
VI	4 (*ccrA4ccrB4*)	B
VII	5 (*ccrC*)	C1
VIII	4 (*ccrA4ccrB4*)	A
IX	1 (*ccrA1ccrB1*)	C2
X	7 (*ccrA1ccrB6*)	C1
XI	8 (*ccrA1ccrB3*)	E

Además de los elementos específicos que conforma el SCC*mec,* se ha observado como diferentes elementos genéticos móviles (EGMs), que veremos más adelante, son capaces de integrarse en esta estructura y conferir otras propiedades a *S. aureus*. Como es el caso de diferentes genes de resistencia a otros antibióticos que no forman parte del espectro de los β-lactámicos, como son los aminoglucósidos, macrólidos o lincosaminas, tetraciclinas y trimetroprim sulfametoxazol (**Tabla 4**) (Hiramatsu et al., 1999;; Li et al., 2011; Turlej et al., 2011). Asimismo, se ha constatado la adquisición de algunos factores de virulencia que han podido integrarse en el cassette, como son las secuencias que codifican resistencia a metales pesados, como al mercurio (SCCmer) o al ácido fusídico (SCC MSSA 476), secuencias para biosíntesis capsular (SCCcap1), para la protección del ADN por sistemas de modificación-restricción (SCC CI), o para el catabolismo de la arginina (ACME) (Hanssen et al., 2006).

Tabla 4. Genes de resistencia localizados en EGMs dentro del SCC*mec*

EGM	SCC*mec*	Gen/es	Resistencia
pUB110	I, II, IVa	*ble*/*ant*(4')-Ia	Bleomicina/tobramicina
Tn554	II, VIII	*erm*(A)/*spc*	Estreptomicina/espectinomicina
pT181	III, V	*tet*(K)	Tetraciclina
ψTn554	III	*cad*	Cadmio
Tn4001	IV (IVa y $IV_{2B\&5}$)	*aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*	Aminoglucósidos

Cabe destacar el último de los cassettes cromosómicos detectados hasta la fecha. Se trata del SCC*mec* XI, cuya particularidad reside en que alberga nuevos determinantes de resistencia como el gen *mecC* (previamente conocido como $mecA_{LGA251)}$ y el gen *blaZ*-SCCmecXI, confiriendo una nueva forma de resistencia a meticilina y penicilina, respectivamente (Shore et al., 2011). Inicialmente fue detectado en aislados SARM procedentes de ganado bovino que presentaban mastitis (García-Alvarez et al., 2011), extendiéndose con rapidez al ámbito humano (Paterson et al., 2014). Este nuevo determinante de resistencia a meticilina, el gen *mecC*, presenta una homología cercana al 70% con el gen *mecA* y se ha determinado que la cefoxitina tiene mayor sensibilidad que la oxacilina para determinar su resistencia en test de difusión disco-placa (Skov et al., 2014).

7.2. Tipado del locus *agr* estafilocócico

El locus *agr* (accesory gene regulator) es un sistema genético de regulación global de la virulencia del género *Staphylococcus* y fue descrito por primera vez en *S. aureus*. Está conservado en todo este género pero ha divergido entre líneas que parecen paralelas a la especiación y subespeciación dentro de éste (Wright et al., 2005). Se trata de un operón en el que se engloba un sistema de transducción de señales de dos componentes, responsable del control de la expresión de numerosos factores de virulencia y de patogenicidad. Este operón es auto-inducido por un péptido (AIP), que se localiza en el mismo locus, se difunde al interior de la célula diana y actúa como ligando del receptor de la señal cuando la densidad celular es suficiente. Se trata de un sensor de densidad poblacional o detección de quorum y es el único sistema quorum-sensing en su genoma (Traber et al., 2008). Consta de varios genes que se describen a continuación:

- ✓ *agrB* : codifica una proteína de membrana encargada de la translocación y modificación de *agrD.*
- ✓ *agrD* :codifica un octapéptido precursor del AIP (autoinducing peptide).
- ✓ *agrC* : codifica una proteína de membrana receptora de la señal AIP
- ✓ *agrA* : codifica *agrA* que es el regulador de la respuesta. Cuando está fosforilado se une al promotor y activa la transcripción.

El locus o sistema *agr* es conocido por fundamentarse en dos transcripciones divergentes llamadas RNAII y RNAIII. La transcripción RNAII se basa en un operón formado por los cuatro genes previamente mencionados (*agrA, agrB, argC, agrD*). Este operón consiste en un clásico sistema de señal de dos componentes, *agrC* actúa como el receptor de señal mientras que *agrA* actúa como la respuesta reguladora. El sistema de señal del *agr* está

conducido por un péptido autoinducido (AIP) cuyo precursor está codificado en el *agrD*. El *agrB* se encarga de modificar a este precursor y translocarlo fuera de la bacteria en su forma AIP (octapéptido), gracias a la acción de la proteína de membrana que codifica. Posteriormente, el AIP o señal es recogida por otra proteína de membrana (histidina quinasa), codificada por el *agrC* que se activa y provoca a su vez la activación del *agrA* mediante su fosforilación, por lo que la respuesta reguladora se inicia e incide en los promotores de los dos sistemas de transcripción, lo que supone que el sistema ARNII se reactiva, al mismo tiempo que se inicia la transcripción del sistema ARNIII cuyo producto serán moléculas efectoras que favorecerán la producción de los factores de virulencia codificados en el genoma de *S. aureus,* así como otros factores de adhesión que facilitan su colonización y establecimiento (Novick et al., 2003; Shopsin et al., 2003) (**Figura 8**).

Las cepas de *S. aureus* se pueden clasificar en función del tipo del locus *agr* que contengan en cuatro tipos diferentes: *agr*I, *agr*II, *agr*III, *agr*IV (Shopsin et al., 2003).

Estudios previos han sugerido que otra de las funciones del locus *agr* podría ser la de facilitar la colonización en el hospedador inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos, incluso al mismo género *Staphylococcus*. Lo que afecta a la transmisión entre hospedadores y a la epidemiología de los diferentes clones o líneas genéticas del género. Como es el caso del *agr*IV, cuya principal función es la de inhibir el crecimiento de S. *epidermidis* en beneficio de *S. aureus*. Además se cree que la expresión del *agr* es crucial en las primeras etapas de infección (Shopsin et al., 2003; Traber et al., 2008).

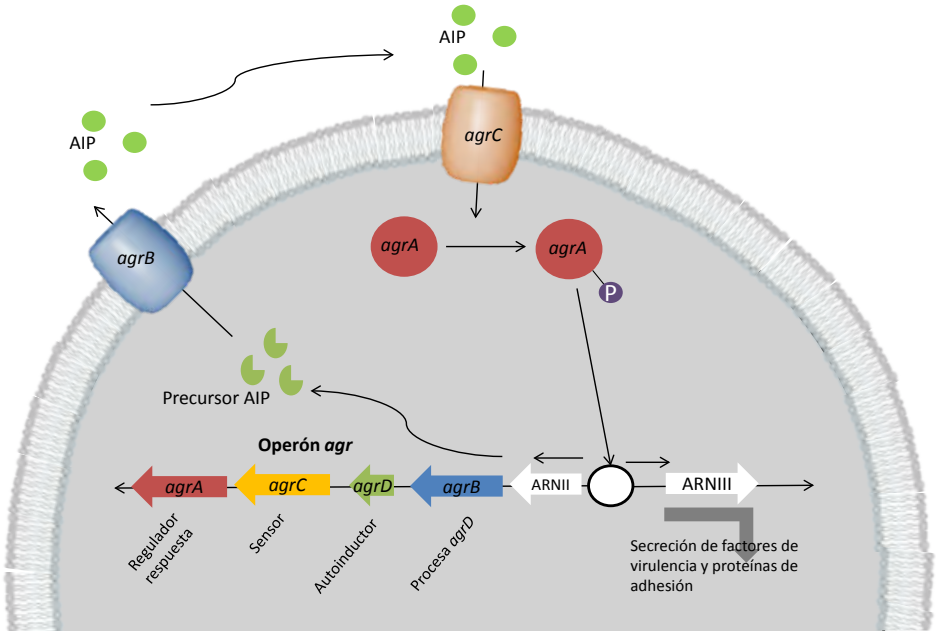


Figura 8. Esquema representativo de la organización y funcionamiento del locus *agr*

7.3. Tipado por Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST)

Se trata de una técnica desarrollada en 1998 (Maiden et al., 1998) que se basa en el análisis de la secuencia nucleotídica de fragmentos internos (de aproximadamente 500/700 pares de bases) de unos genes denominados "housekeeping". Estos genes codifican enzimas metabólicas, de ahí que se encuentren de forma ultraconservada en el genoma de *S. aureus,* aunque con pequeñas modificaciones en el código genético. Es una buena técnica para identificar clones y/o líneas clonales para determinar la estructura poblacional bacteriana. Este análisis permite detectar variaciones neutras en la secuencia codificante de las enzimas metabólicas que no están sometidas a presión selectiva, lo que facilita la clasificación de *S. aureus* en líneas clonales estables (Dominguez et al., 2005).

En el caso de *S. aureus*, la técnica se aplicó por primera vez en el año 2000 (Enright et al., 2000) y los 7 genes housekeeping seleccionados fueron los siguientes:

- ✓ *arcC* (carbamato quinasa)
- ✓ *aroE* (shikimato deshidrogenasa)
- ✓ *glpF* (glicerol quinasa)
- ✓ *gmk* (guanilato quinasa)
- ✓ *pta* (fosfato acetiltransferasa)
- ✓ *tpi* (triosafosfato isomerasa)
- ✓ *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa)

La secuencia de cada uno de estos genes conforman un alelo y cada uno de ellos se compara con los alelos conocidos, estándar y accesibles desde la página www.mlst.net. Para la comparación se utilizan diferentes herramientas bioinformáticas de alineamiento y comparación, presentes en la web http://www.ebi.ac.uk, perteneciente al "European Bioinformatics Institute". Mediante el soporte de ambas webs obtenemos el perfil alélico de cada uno de los genes, lo que nos permite la determinación de la secuencia tipo (ST). Posteriormente, y con ayuda del algoritmo eBurst, que compara las diferencias de los alelos como conjunto, obtenemos un determinado perfil alélico que facilita su adscripción a un determinado complejo clonal (CC). En general, el CC es definido como un conjunto de STs que se difieren entre sí en un solo alelo, cuantos menos alelos compartan dos líneas genéticas o CC, más alejados se encontrarán filogenéticamente.

7.4. Tipado de la región polimórfica del gen -*spa*-

Se trata de una técnica desarrollada en 1996 (Frenay et al., 1996), cuyo fundamento se basa en la amplificación y posterior secuenciación de la región polimórfica X constituyente

de una parte del genoma conservado de *S. aureus,* que codifica la proteína de membrana A. Este gen es susceptible de sufrir adiciones, delecciones y/o mutaciones espontáneas en algunos de sus fragmentos repetidos. De esta manera, analizando el número de repeticiones y su variabilidad se pueden asignar distintos tipos *spa* (Harmsen et al., 2003). Existe una estrecha correlación entre los tipos *spa* y las secuencias tipo (ST) determinadas mediante la técnica del MLST. A finales del año 2014 se habían descrito más de 14000 tipos *spa*, número que se incrementa a buen ritmo (**Figura 9**).

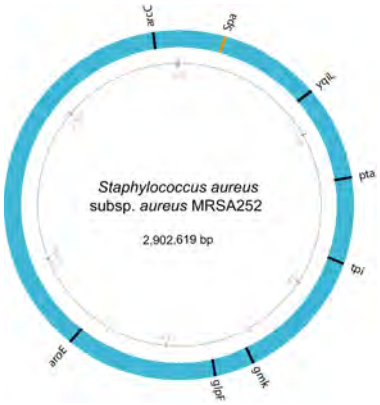


Figura 9. Representación de los genes « housekeeping » utilizados para la técnica MLST y del gen *spa*

Esta técnica de biología molecular es de gran interés en *S. aureus* debido a su rapidez y sencillez (Shopsin *et al*., 2000).

7.5. Tipado mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)

El fundamento de la técnica de PFGE ("Pulse Field Gel Electrophoresis" del inglés) se basa en el análisis del ADN cromosómico total bacteriano mediante su digestión con enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos son analizados mediante electroforesis en campos pulsados. Los patrones de bandas obtenidos para las distintas cepas pueden ser comparados bien visualmente o mediante el uso de herramientas bioinformáticas, que permiten establecer relaciones filogenéticas entre ellas atendiendo al número de similitudes o diferencias en la digestión. Es uno de los métodos de tipado más utilizados en estudios epidemiológicos, ya que permite rastrear la dispersión geográfica de las poblaciones patógenas causantes de enfermedades a nivel local, nacional o internacional.

Esta técnica se empleó por primera vez en *S. aureus* en 1995 (Bannerman *et al*., 1995). Desde entonces, la técnica ha sido considerada como una de las más discriminativas a la hora de estudiar brotes hospitalarios y/o comunitarios. En el caso de *S. aureus,* la enzima de elección utilizada para la digestión del ADN bacteriano es *Sma*I, y una vez obtenidos los perfiles electroforéticos de cada aislado se siguen los criterios de Tenover et al., 2005, con el fin de analizar sus relaciones genéticas. La estandarización de la técnica mediante un protocolo

global y una nomenclatura común es crucial para el intercambio de conocimiento con ciertas garantías, por ello, Murchan et al., 2003 propuso unas directrices comunes englobadas en el "Harmony PFGE protocol".

Sin embargo, poco después surgieron nuevas líneas genéticas que resultaban no tipables mediante la enzima *Sma*I. Es el caso de la línea genética ST398, cuyas características veremos más adelante. En este caso se hace necesaria la utilización de otras enzimas de restricción tales como *Apa*I, *Bst*ZI, *Cfr*9I, *Sac*II o *Xma*I, cuya eficiencia ya ha sido comprobada por varios autores (Bosch *et al*., 2010; Kadlec *et al*., 2009b; Rasschaert *et al*., 2009, Vandendriessche et al., 2014).

8. VARIABILIDAD GENÉTICA EN *S. aureus*. FUNCIÓN DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES (EGMs)

Las técnicas de biología molecular anteriormente citadas han resultado muy útiles para la detección, tipificación y seguimiento de rasgos genéticos cromosómicos que los diferentes aislados de *S. aureus* han ido adquiriendo de una manera vertical a través de la herencia natural o por mutaciones puntuales. Asímismo, *S. aureus* también ha demostrado ser un microorganismo con gran capacidad de adaptación a diferentes medios y situaciones, y en este caso, la diseminación o adquisición de diferentes determinantes de resistencia y virulencia mediante mecanismos de transmisión genética horizontal intra e interespecie, han sido claves para ampliar su ubicuidad y capacidad de colonización y/o infección. A menudo, estos determinantes de resistencia y virulencia, están integrados en estructuras genéticas con un perfil de movilidad significativo, por lo que a estas estructuras se las denomina elementos genéticos móviles (EGMs) (Frost et al., 2005). Son tres los mecanismos principales mediante los cuales los EGMs se movilizan de una bacteria a otra: conjugación, transformación y transducción (**Figura 10**).

El mecanismo de conjugación bacteriana suele producirse a través de unas estructuras denominadas pilis sexuales, que se forman de manera natural entre dos bacterias diferentes. Mediante la conjugación se movilizan algunos transposones y la mayoría de plásmidos, sobre todo los conjugativos. La transformación bacteriana se basa en la adquisición de material genético que ha quedado libre en el medio externo tras una reciente lisis bacteriana; este mecanismo, aunque no es muy eficiente, requiere de bacterias receptoras competentes para poder captar el ácido nucleico. Por último, la transducción de material genético se realiza a través de bacteriófagos que vehiculizan diversos determinantes de virulencia y resistencia. Los bacteriófagos, mediante la infección a bacterias, son capaces de

adquirir ADN del hospedador, integrarlo en su estructura génica y transmitirlo a la siguiente bacteria en una nueva infección. La transducción es el mecanismo de transferencia genética horizontal con más peso en la variabilidad genética de *S. aureus* (Davison et al., 1999; McCarthy et al., 2012).

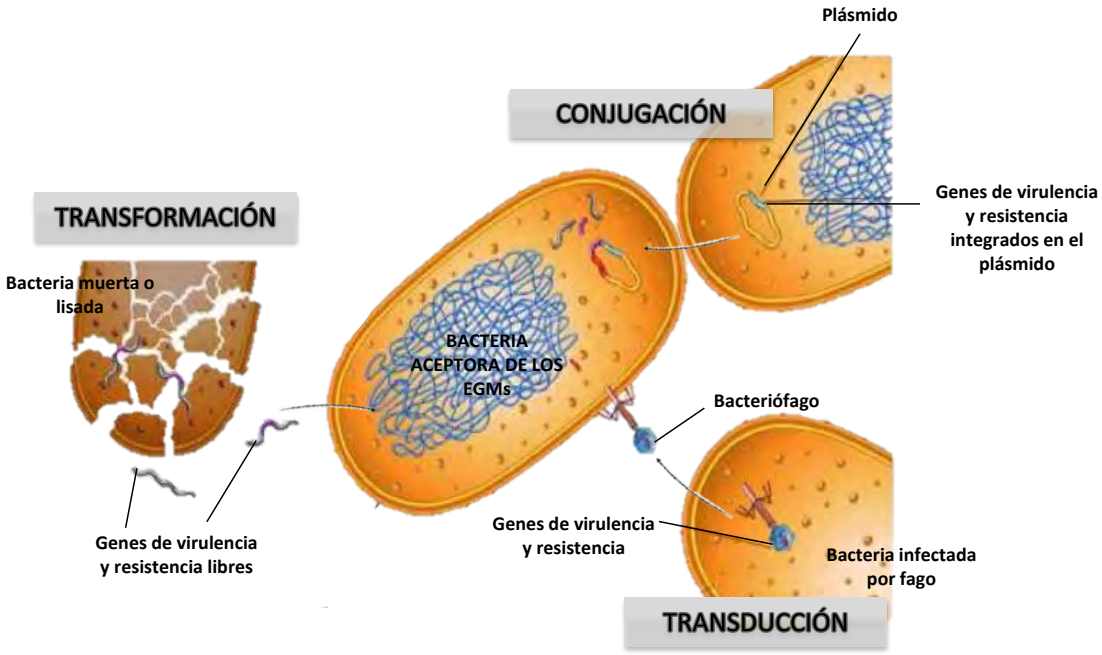


Figura 10. Representación de las principales vías de transmisión de los EGMs.

Son muchos los EGMs que son capaces de aportar nuevo material genético a *S. aureus*, entre los que destacan: casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC), secuencias de inserción (IS), transposones (Tn), islas genómicas (νSA), islas de patogenicidad (SaPIs), plásmidos y bacteriófagos, siendo los dos últimos los más variables. Frecuentemente los EGMs contenidos en los anteriores vectores, son regulados de una manera centralizada a través de mecanismos codificados en el núcleo genómico conservado de *S. aureus* (o core genome, en inglés) (Malachowa et al., 2010).

Casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC)

Más conocidos por su siglas SCC, son grandes fragmentos de ADN que se insertan a partir del gen *orfX* (open reading frame o marco de lectura abierto cromosómico) presente de forma conservada en el genoma de *S. aureus*. Al ser tan grandes, pueden codificar varios genes de resistencia y/o virulencia y cambiar de forma significativa el perfil patogénico de la bacteria. El más conocido es el SCC*mec*, por contener en la mayoría de los casos alguno de los genes de

resistencia a meticilina como el *mecA* o *mecC,* (Malachowa et al., 2010; Shore et al., 2011), como ya se ha comentado anteriormente.

Secuencias de Inserción (ISs)

Las ISs son fragmentos de ADN de 700-1000 pb, que fundamentalmente integran una enzima denominada transposasa (gen *tnp*), con secuencias génicas invertidas (RI) a ambos lados (Wagner et al., 2006) (**Figura 11**). Las ISs tienen gran capacidad de producir delección, adición o reorganización de material genético dentro del genoma estafilocócico. Como es el caso de la IS256 e IS257 capaces de recombinar los promotores encargados de la expresión de genes de resistencia a algunos antimicrobianos de la familia de los aminoglucósidos y diaminopirimidinas, como *aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia* y *dfrS1*, potenciando su expresión (Malachowa et al., 2010). Estudios recientes han demostrado que la IS256 es también capaz de alcanzar un alto número de copias en el cromosoma e integrarse en el promotor encargado de la represión toxigénica estafilocócica (*rot*) truncándolo; de esta forma, *S. aureus* adquiere un perfil hipervirulento que magnifica su patogenicidad (Benson et al., 2014). Aunque pueden encontrarse como un elemento independiente más de los SCC, normalmente se encuentran asociadas a transposones (Byrne et al., 1989), de hecho las ISs son denominadas también transposones simples.

Transposones (Tns)

Son secuencias genéticas más grandes que las anteriores (2-50 kb) ya que, a menudo, las ISs, que están integradas en ellos, flanquean otra estructura genética variable (**Figura 11**). Los transposones están compuestos por fragmentos de ADN que codifican varios genes de resistencia y que pueden ser movilizados de una bacteria a otra gracias a la maquinaria de las ISs. Su localización puede ser cromosómica o plasmídica (Wagner et al., 2006). En general están relacionados con gran número de determinantes de resistencia, sobre todo aquellos que confieren resistencia a penicilina, macrólidos, lincosaminas, fenicoles, tetraciclinas, diaminopirimidinas y glicopéptidos. En base a su estructura, componentes y capacidad recombinante, los transposones más complejos pueden ser clasificados en varios grupos atendiendo a una nomenclatura global (Roberts et al., 2008):

Transposones conjugativos: son elementos con capacidad de escindirse del genoma de una bacteria, transferirse de forma conjugativa a otra bacteria y posteriormente integrarse en otro genoma bacteriano. Suelen estar formados por un gran número de genes que permiten esta maquinaria, además de integrar diferentes genes de resistencia como es el caso del gen *tet*(M), presente en el transposon Tn*6014* (de Vries et al., 2009). Algunos son tan

grandes que hasta son capaces de movilizar otros EGMs como partes de islas de patogenicidad, como el Tn*6013* (Everitt et al., 2014).

Transposones compuestos: estructuralmente formados por una región central flanqueada a ambos lados por ISs variables entre ellas y con marcos de lectura que, a menudo, cambian de orientación. A su vez contienen genes de resistencia, preferentemente en la región central. Suelen ser monocopia dado el gran tamaño que pueden alcanzar. Asociados a la integración de genes de resistencia a diaminopirimidinas, aminoglucósidos y/o vancomicina (Malachowa et al., 2010).

Transposones de la familia Tn3: se caracterizan por codificar dos enzimas, una involucrada en la escisión e integración genómica (transposasa) y otra responsable de la recombinación del fragmento en dianas específicas (resolvasa). En este caso pueden presentarse en multicopia al ser de pequeño tamaño y suelen estar integrados como partes de plásmidos conjugativos. Destaca el Tn*554* por codificar genes de resistencia a macrólidos, el Tn559 que porta genes de resistencia a diaminopirimidinas y el Tn*558* responsable de algunos de los mecanismos de resistencia a fenicoles (Murphy et al., 1983; Kadlec et al., 2010c; Kehrenberg et al., 2005).

Transposones movilizables: elementos dependientes de la colaboración de otros componentes que ayudan a generar poros conjugativos para facilitar su movilización.

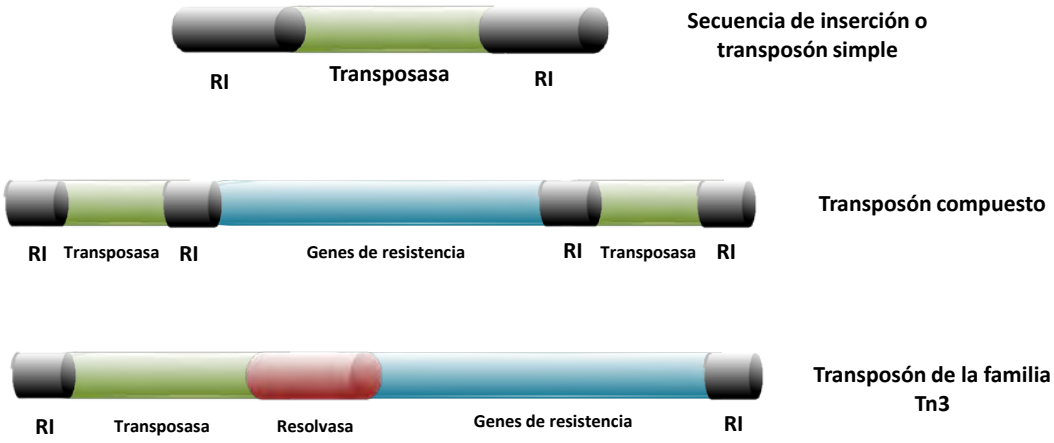


Figura 11. Esquema simplificado de algunos de los transposones más representativos en *S. aureus*

Islas genómicas (νSA)

Originadas a partir de la transferencia horizontal genética, se encuentran flanqueadas por otros EGMs truncados, como transposasas, y por sistemas de restricción y/o modificación genética. Existen tres grandes familias descritas: νSAα, νSAβ y νSAγ (Malachowa

et al., 2010). Destaca νSAβ por contener los genes de virulencia *luk-DE* y los genes de las enterotoxinas *seg, sei, sem, sen, seu*, entre otras (Argudín et al., 2011).

Islas de patogenicidad estafilocócica (SaPIs)

Son fracciones de ADN con tamaños comprendidos entre 14-17 kb. Hasta la fecha se han descrito 16 SaPIs diferentes. Al ser EGMs que se encuentran en forma libre y sin estructuras de movilización horizontal, requieren de la presencia de un fago como vehiculizadores para su posterior integración en uno de los diferentes puntos cromosómicos de inserción específica (*atts*) (Novick et al., 2007; Lindsay et al., 2010). Suelen codificar enterotoxinas, la toxina del síndrome del shock tóxico y la exfoliatina D (Yarwood et al., 2002; Novick et al., 2007).

Plásmidos

Son moléculas circulares de ADN bicatenario y con capacidad autoreplicativa. Existe una gran variabilidad en el tamaño de éstos EGMs, encontrándose elementos que oscilan entre las 2 kilobases (kb) hasta 400 kb (Schwarz et al., 2011). Aunque no portan información importante relacionada con el metabolismo y funciones vitales de la bacteria, contienen un alto número de determinantes genéticos, sobre todo de resistencia a antimicrobianos, que permiten a *S. aureus* sobrevivir a la presión selectiva generada por éstos. A su vez son independientes de los mecanismos de multiplicación, mantenimiento y propagación de la bacteria, puesto que también codifican sus propios mecanismos (Garcillán-Barcia et al., 2011). Se encuentran en número variable en las bacterias, pudiendo haber más de un plásmido diferente en una misma bacteria (Malachowa et al., 2010). En general podemos clasificar a cada plásmido en tres grandes grupos, clasificación propuesta por Novick et al., 1989: i) plásmidos pequeños multicopia que en general portan un solo determinante de resistencia y que tienen replicación mediante circulo rodante; ii) plásmidos grandes con menor número de copias que suelen portar varios genes de resistencia y, iii) plásmidos conjugativos que suelen presentar un gran número de genes de resistencia y que disponen de toda una maquinaria autónoma para movilizarse a otras bacterias, aunque no son los más prevalentes en *S. aureus* (Lindsay et al., 2010). A efectos de ésta capacidad de movilización podemos subdividir a los plásmidos en: i) Plásmidos movilizables que no poseen la maquinaría completa que les permite la movilidad independiente, por lo que necesitan de la ayuda de los plásmidos conjugativos; ii) Plásmidos no móviles que necesitan integrarse en otros plásmidos, ya sean conjugativos o movilizables, para poder llevar a cabo su transmisión. Estos suelen ser los pertenecientes al grupo i) de la clasificación anterior. Posteriormente se han ido añadiendo pequeñas

excepciones a éstas clasificaciones aunque sin llegar a conseguir un consenso mundial al respecto. En la actualidad, el desarrollo de la biología molecular ha permitido esbozar nuevos métodos de clasificación basados en la secuenciación de los genes implicados en la replicación de cada uno de estos plásmidos, denominados genes *rep* (Lozano et al., 2012).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos o también conocidos como fagos, son virus de estructura sencilla que infectan exclusivamente a las bacterias. Son uno de los EGM con más peso en la variabilidad genética de *S. aureus*. Desde el punto de vista de la microbiología podemos subdividirlos en tres grandes familias: i) fagos líticos, con capacidad de lisar la bacteria una vez se han multiplicado y dividido; ii) fagos atemperados, con la misma capacidad que los anteriores pero pudiendo quedarse de manera latente en la bacteria sin destruirla, integrados en el cromosoma; iii) fagos crónicos o lisogénicos, con capacidad de infectar a la bacteria, utilizar su maquinaria para la producción de partículas víricas, pero sin llegar a destruirla (Mann et al., 2008; Malachowa et al., 2010). Desde el punto de vista genético, en función de la secuencia de la integrasa que los introduce en el genoma bacteriano, existen siete grandes familias: Saϕ1, algunos de ellos portan genes que codifican exfoliatinas; Saϕ2, estrechamente relacionados con la toxina LPV; Saϕ3, vehiculizan los genes que componen el IEC; Saϕ4, menos estudiado; Saϕ5, portan los genes codificantes de algunas leucocidinas asociadas a animales y la subunidad F de la toxina LPV; Saϕ6 y Saϕ7, aunque menos estudiados, han sido relacionados con algunos genes de carácter invasivo (Lindsay et al., 2004; Goerke et al., 2009). Aunque algunos de estos genes se han relacionado de forma específica con el ámbito humano, como el *Saφ3*, todavía se desconocen muchos de los mecanismos por los que una misma bacteria puede estar infectada por un solo fago de manera exclusiva o por hasta varios fagos a la vez. La importancia de los genes de virulencia que vehiculizan y transfieren a *S. aureus*, los convierte en el EGM que más interés está suscitando en los últimos años y cuyo estudio se hace imprescindible (Lindsay et al., 2010).

En resumen podríamos concluir que los plásmidos y transposones son los EGMs que se asocian con más frecuencia con la integración de genes de resistencia; mientras que las islas de patogenicidad y, sobre todo, los bacteriófagos, se relacionan de una manera directa con la vehiculización de determinantes de virulencia.

9. EPIDEMIOLOGÍA DE SARM Y LINEAS GENÉTICAS. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *S. aureus* EN DIFERENTES AMBIENTES.

Como hemos visto en los epígrafes anteriores, *S. aureus* es una bacteria que dispone de una amplia gama de mecanismos para invadir nuestro organismo, evadir las primeras barreras de nuestro sistema inmunitario y lograr una colonización exitosa. Asímismo, su importante patogenia reside en su capacidad para producir una extensa batería de toxinas y factores de virulencia que le permiten producir multitud de cuadros clínicos que, además, son difíciles de resolver dada la capacidad del microorganismo para captar e integrar diferentes mecanismos de resistencia a la mayoría de antimicrobianos conocidos. Por si fuera poco, su genoma está en constante evolución gracias a la interacción con los EGMs que moldean las características propias de cada cepa bacteriana hasta hacerlas aptas ante los cambios que se van sucediendo a su alrededor. Por ello, no podemos hablar de un estándar genético en *S. aureus*, tan sólo podemos agruparlas en base a diferentes características moleculares que presentan algunos aislados en base a su área de diseminación o nicho ecológico, es entonces cuando hablamos de diferentes líneas genéticas de *S. aureus* o SARM, que están conformadas por diversos complejos clonales (CC) que tienen adscritas diversas secuencias tipo (ST).

A día de hoy podemos distinguir tres grandes grupos de SARM que albergan a la mayoría de líneas genéticas conocidas: SARM-AH (líneas asociadas al ámbito hospitalario), SARM-AC (líneas asociadas a la comunidad) y SARM-AG (líneas asociadas a un origen animal) (Deurenberg et al., 2009; Pantosi et al., 2012; Chua et al., 2014). En la **figura 12** podemos ver un breve resumen del contenido que se desarrollará en este epígrafe:

Figura 12. Diagrama simplificado de las principales líneas genéticas de *S. aureus* en relación al entorno en el que han sido detectadas

9.1. SARM asociado a ambientes hospitalarios (SARM-AH)

Desde el descubrimiento del primer *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en un hospital de Inglaterra (Jevons et al., 1961) y un posterior brote epidemiológico en un hospital pediátrico en 1963 (Stewart et al., 1963), el número de casos clínicos por SARM en todo el mundo creció de manera exponencial hasta convertirse en un grave problema epidemiológico, alzándose como la primera causa etiológica en las infecciones nosocomiales en muchos hospitales del mundo. Surgió entonces el concepto de SARM asociado a ambientes hospitalarios (SARM-AH) (Enright et al., 2002; Grundmann et al., 2006). Ya en la década de los 80, las cepas SARM se extendían en hospitales de Europa, Australia y Estados Unidos y la prevalencia por SARM fue claramente en aumento, pasando de tasas inferiores al 1% en 1980 hasta valores cercanos al 30% en 1990 en Europa. Para Estados Unidos, Brasil, Colombia, Sudáfrica, Australia, Japón, Vietnam o Corea, el incremento entre 1990-2000 se disparó hasta prevalencias que rondaban o superaban el 50%, según la National Nosocomial Infections Surveillance. En otros países se encontraron valores intermedios, dándose las prevalencias más bajas en Canadá y Arabia Saudí (5-10%) y algo más elevadas en México, Venezuela, Marruecos, India o Túnez (10-25%) (Grundmann et al., 2006; Stephanie et al., 2012).

Si nos centramos en el continente Europeo, encontramos grandes diferencias entre los países relativas a la incidencia por SARM, formando un gradiente ascendente de Norte a Sur (**Figura 13**). Según los datos publicados por el Sistema de Vigilancia Europeo de Resistencias (www.earss.rivm.nl), en los países del Norte como Finlandia, Suecia, Noruega, Dinamarca, además de Holanda, la incidencia es menor (<1%-5%), mientras, en los países centroeuropeos se encuentran valores medios (10-25%) y es en el Sur de Europa, en España, Francia, Italia, Portugal o Grecia, además del Reino Unido donde las prevalencias por SARM alcanzan los máximos del continente (25-50%), valores que ya se están empezando a dar en países del Este, como Rumania o Eslovaquia. Estas diferencias se atribuyen a las distintas políticas de uso de antibióticos presentes en cada país y a diferentes programas de control de microorganismos. Si bien es cierto que desde 2007 la Unión Europea comenzó a adoptar políticas activas para la contención del problema emergente por SARM y los resultados han sido positivos, observándose una clara disminución de la prevalencia en 2013, en aquellos países adscritos al programa (**Figura 13**).

Los países que han notado una disminución más evidente son: Austria, Francia, Irlanda, Reino Unido y España. Por el contrario, aumenta su prevalencia en Rumanía y aparece una alta prevalencia en Eslovaquia. Italia, Portugal y Grecia donde todavía se alcanzan tasas que oscilan entre el 25-50%. En el caso concreto de España, la prevalencia ha ido

disminuyendo lentamente, desde un 25.5% de SARM en aislamientos invasivos en 2007 hasta un 22,6% en 2013.

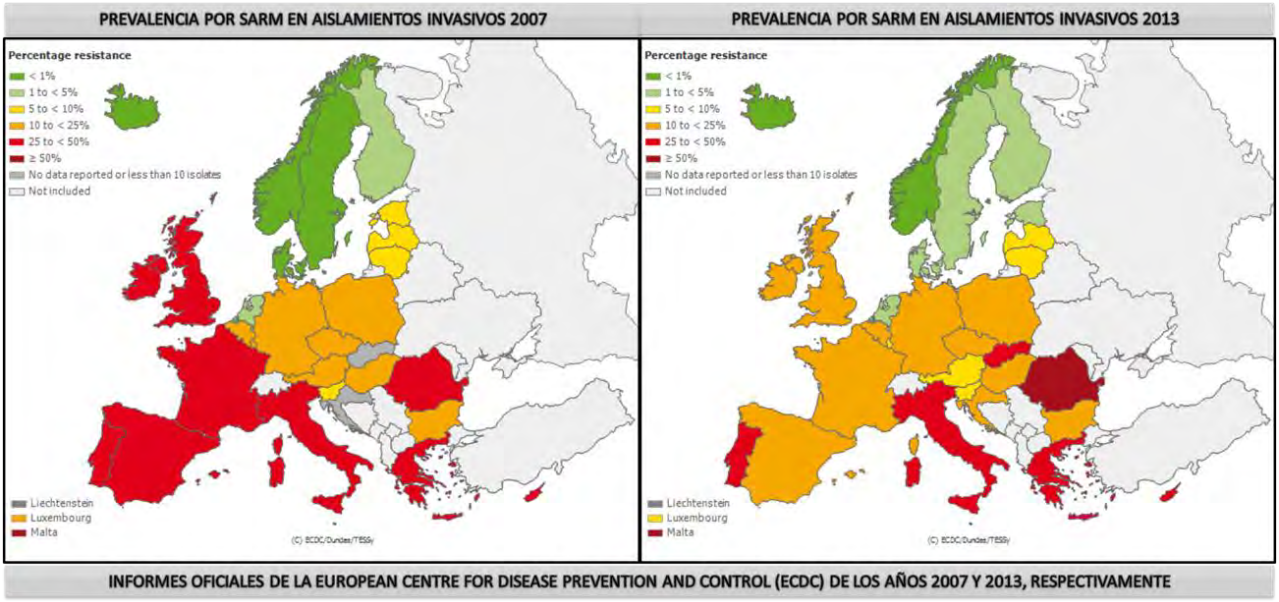


Figura 13. Prevalencias por SARM en aislamientos invasivos en 2007 y 2013. Informes realizados por la ECDC

En relación a las líneas genéticas predominantes en el ámbito hospitalario, se ha evidenciado que existe una menor diversidad clonal entre los aislados resistentes a meticilina (SARM) que entre aquellos que son sensibles a ella (SASM) (Grundmann et al., 2010). Suelen darse coincidencias regionales en diferentes países europeos, por ejemplo Reino Unido e Irlanda comparten mayoritariamente la línea genética t032/ST22/CC22-SCC*mec* IV (también conocida como clon epidémico europeo EMRSA-15), mientras, en Italia y Croacia suele predominar la línea tipada como t041/ST228/CC5-SCC*mec* I. Asimismo, en Alemania y la República Checa destaca el clon t003/ST225/CC5-SCC*mec* II, mientras que en Bulgaria y Rumania la línea genética predominante es t030/ST239/CC5-SCC*mec* III (**Figura 14**).

En lo que respecta a España, se han ido produciendo cambios importantes durante las últimas décadas y el que fue denominado en los 90 como clon ibérico (ST247/CC5-SCC*mec* I), ha sido sustituido por otra línea genética, t067/ST125/CC5-SCC*mec* IV, ampliamente distribuida por toda la geografía peninsular (Grundmann et al., 2010; Lozano et al., 2013). No es difícil darse cuenta de que casi todos las líneas genéticas europeas asociadas a ámbitos hospitalarios están integradas en un gran complejo clonal, el CC5, y es que se cree que algunas de ellas, entre las que se encuentra la española, descienden de un mismo clon ancestral pediátrico (ST125/CC5-SCC*mec* IV) (Argudín et al., 2009).

Cabe destacar que las cepas SARM-AH, por lo general, presentan amplios fenotipos de multirresistencia a antibióticos, en detrimento de un perfil de virulencia mucho más discreto (Chua et al., 2014) (**Tabla 5**), aunque la dispersión de los diferentes clones a lo largo

del mundo y la adquisición de nuevo y variado material genético comienza a dificultar la definición de los límites de estas líneas genéticas (Harris et al., 2010; Stefani et al., 2012).

9.2. SARM asociado a la comunidad (SARM-AC)

Aunque SARM fue asociado exclusivamente con infecciones nosocomiales, en las que el contacto con el ámbito hospitalario era la variable de riesgo más frecuente, en 1993 se describió el primer aislado de otro grupo de SARM, los asociados a la comunidad (SARM-AC) (Udo et al., 1993). Durante los años inmediatos posteriores se comenzó una carrera de investigación con el objetivo de detectar este tipo de cepas y los factores de riesgo que se asociaban a su implicación en infección, que parecían distar de los causantes de infección por SARM-AH. En las últimas décadas del siglo XX y primera del XXI se describió el SAMR-AC como agente etiológico de infecciones que principalmente afectaban a la piel, mucosas y otros tejidos blandos, y con menor incidencia, también eran responsables de algunos casos clínicos relacionados con bacteriemias y otras patologías de carácter necrosante (Lo et al., 2009; Mediavilla et al., 2012). Éstos y otros estudios sugieren que, aunque los casos tienen una naturaleza esporádica, la facilidad de contagio por contacto estrecho comunitario podría ser la causa de la aparición de este tipo de infecciones a modo de brotes puntuales y localizados (Deresinski et al., 2005; Stegger et al., 2014).

Aunque las líneas genéticas definidas inicialmente como SARM-AC están comenzando a desplazar a las SARM-AH como causa de infecciones nosocomiales (Mediavilla et al., 2012) por adquisición de características genéticas propias de SARM-AH (Stefani et al., 2012), todavía podemos enumerar algunos de los clones que han sido asociados de manera tradicional a infecciones por SARM de origen comunitario, como son ST5/CC5, ST8/CC8, ST30/CC30, ST59/CC59 o ST80/CC80, diseminados principalmente por Europa y, sobre todo, Estados Unidos, donde se han convertido en un grave problema endémico (Enright et al., 2002; Vandenesch et al., 2003; Faria et al., 2005; Kallen et al., 2010; Stegger et al., 2014) (**Figura 15**).

Las líneas genéticas asociadas a SARM-AC poseen características propias que las diferencian de las SARM-AH. Por lo general, las comunitarias presentan perfiles de virulencia más extensos (especialmente por encontrarse en un gran número de ellas la toxina PVL), mientras que no suelen contener en su genoma muchos determinantes de resistencia, aparte de los de resistencia a β-lactámicos (Chambers et al., 2009; Chua et al., 2014). Sin embargo, existen algunas excepciones, como en el clon comunitario más prevalente en EEUU, ST8/CC8 o USA300, donde también han sido descritas resistencias a macrólidos, clindamicina y tetraciclina (Tenover et al., 2009). En la **tabla 5** se muestran las diferencias fundamentales encontradas entre los aislados SARM-AC y SARM-AH.

Tabla 5. Principales diferencias entre SARM-AH y SARM-AC

	SARM-AH	SARM-AC
Líneas genéticas	CC5, CC8, CC22, CC30, CC45	CC1, CC8, CC30, CC59, CC80, CC88, CC93
SCC*mec*	I, II, III	IV, V, VII
agr	III	I, II
Virulencia	No LPV (normalmente)	LPV
Fenotipo de resistencia	A menudo multirresistentes	Generalmente sólo resistente a β-lactámicos
Paciente tipo	Ancianos, personas debilitadas o con infecciones crónicas	Niños y jóvenes; atletas y deportistas; personal militar; reclusos; drogadictos
Factores de riesgo	Inmunodeprimidos, cirugía, catéteres, hospitalización previa	Deportistas de contacto, reclusos, guarderías, drogadictos, soldados
Cuadro clínico	Cuadros clínicos graves. A menudo bacteriemia o neumonía	Infección de piel y partes blandas en general leves Grave en casos de neumonía necrótica, bacteriemia, shock séptico

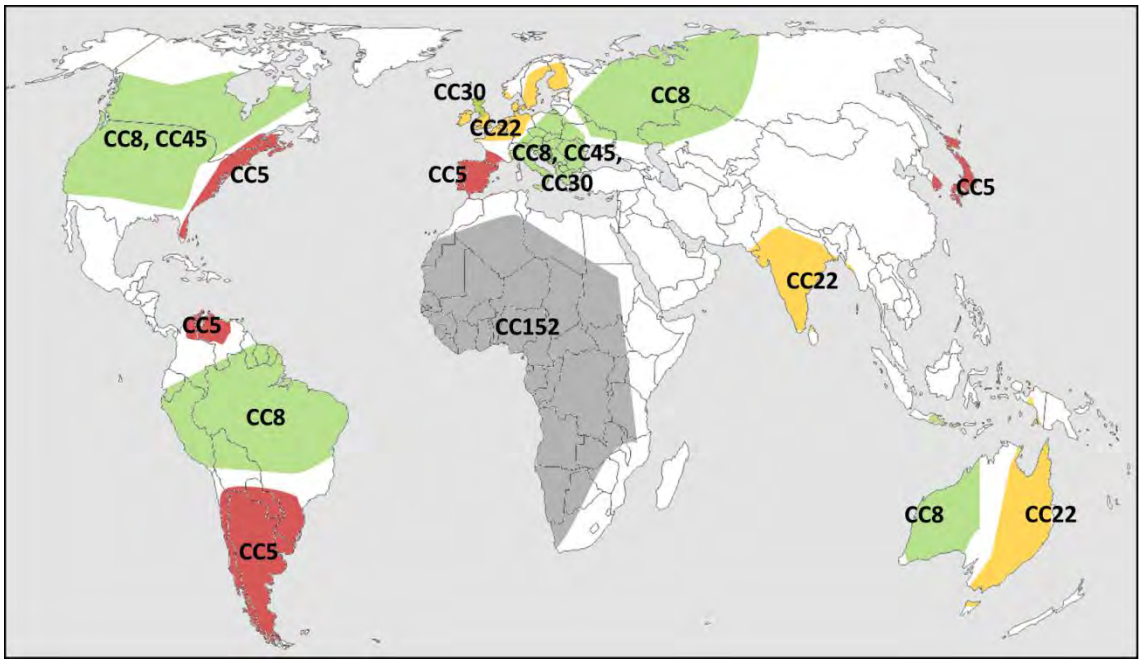


Figura 14. Líneas genéticas mayoritarias (complejos clonales) de SARM-AH a nivel global

Sin embargo, debemos tener en cuenta que los límites de estas agrupaciones se vuelven día a día más difusos, debido fundamentalmente a la gran capacidad de *S. aureus* para adquirir o perder material genético, confiriéndole así nuevos perfiles de virulencia y resistencia que le permiten su diseminación por los distintos nichos ecológicos, como ocurre con el CC5,

CC8, CC30 y CC152 que comparten un origen clínico y comunitario (Uhlemann et al., 2014; Conceiçao et al., 2013).

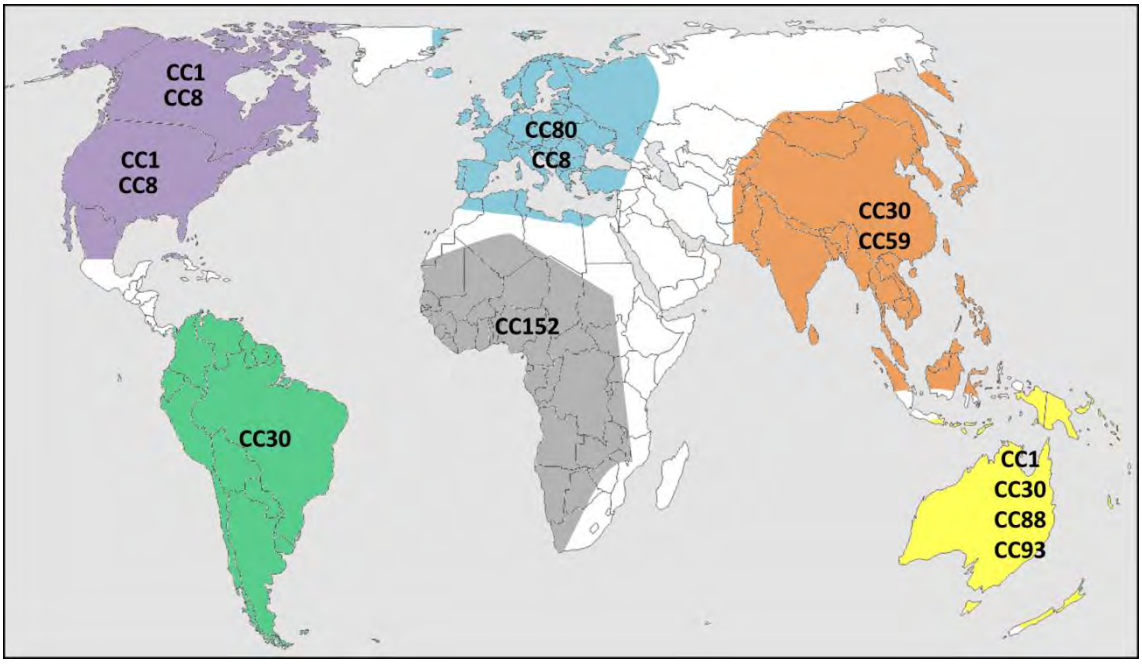


Figura 15. Líneas genéticas mayoritarias (complejos clonales) de SARM-AC a nivel global

9.3. SARM asociado a animales y potencial zoonótico

Como se ha comentado anteriormente, los aislados SARM son importantes agentes etiológicos causantes de infecciones humanas de carácter nosocomial o comunitarias. Sin embargo, en los últimos años existe un gran interés y preocupación por la diseminación de cepas SARM en el ámbito animal. La primera cepa SARM que se describió en animales procedía de mastitis bovina en 1972 (Devriese et al., 1972). La estructura poblacional de las comunidades de SARM existentes tanto en animales de compañía como en animales de producción ha añadido todavía más variabilidad a la epidemiología de este microorganismo (Lee et al., 2003; Harrison et al., 2013; Harrison et al., 2014) por su papel como reservorio de líneas genéticas nuevas o conocidas y su posterior transferencia al hombre (McCarthy et al., 2012) (**Figura 16**).

9.3.1. SARM asociado a animales de producción o ganado (SARM-AG)

En producción animal han emergido líneas genéticas de SARM o SASM que están acaparando gran protagonismo en la actividad científica en torno a *S. aureus.* Estas líneas genéticas, adscritas a los complejos clonales CC1, CC9, CC97, CC130, CC133 o CC398 han sido detectadas en vacas, ovejas, caballos, cerdos o pollos, entre otros, presentando una

estructuras poblacionales muy asociadas a los diferentes orígenes (Armand-Lefevre et al., 2005; Ellington et al., 2008; Lowder et al., 2009; Smith et al., 2008; Cui et al., 2009; Gómez-Sanz et al., 2010; Guinane et al., 2010; García-Alvarez et al., 2011; Cuny et al., 2011, Paterson et al., 2014). Se trata de un tema candente desde comienzos del siglo XXI debido a la rápida expansión de estos clones, al alto impacto económico que pueden conllevar en el sector ganadero y los severos cuadros clínicos que son capaces de provocar en el hombre por zoonosis (Fitzgerald et al., 2012). Veamos algunas de ellas y sus implicaciones con más detalle:

SARM-AG de la línea genética CC398

Las primeras cepas fueron detectadas en Francia en poblaciones de ganado porcino en 2005 (Armand-Lefevre *et al*., 2005; Voss *et al*., 2005). Desde entonces su expansión y diseminación en otros países europeos (Witte *et al*., 2007; Pomba *et al*., 2009; Crombé et al., 2013) y otros continentes como Norteamérica, Sudamérica o Asia (Cui et al., 2009; Golding *et al*., 2010; Arriola *et al*., 2011; Mediavilla *et al*., 2012) han permitido definir al cerdo como el principal reservorio de esta línea genética (Wulf et al., 2008), aunque no de una forma especie-específica, ya que cada vez son más los casos de detección de este clon en otro tipo de animales de granja o animales de compañía (Graveland *et al*., 2010; Longaric et al., 2013). Puede encontrarse en los animales especialmente como colonizador asintomático, o en algunos casos inusuales como etiológico causante de infecciones (Armand-Lefevre et al., 2005; Vanderhaeghen et al., 2010).

Las características moleculares de esta línea genética son muy variables y a menudo dependen de la localización geográfica del aislado y del hospedador colonizado y/o infectado, siendo los EGMs los que definen algunas de las subpoblaciones de SARM CC398 (Stegger et al., 2010; McCarthy et al., 2011). Aunque su origen no está claro, algunos autores han postulado su origen en la variante SASM CC398 de origen humano (Price et al., 2012), que fue adquiriendo la resistencia a meticilina (mediante SCC*mec*) y otras características genéticas de una manera progresiva.

En general son cepas que pueden presentarse con un gran número de *spa*-types diferentes y múltiples combinaciones del SCC*mec*, habiéndose encontrado SCC*mec* IV, V entre ellas, y menos frecuentemente en VII-variante, IX, X (Vanderhaeghen et al., 2010; Price et al., 2012). Se caracterizan por ser cepas resistentes a meticilina y a tetraciclina de manera habitual pero con gran capacidad por adquirir determinantes de resistencia a antimicrobianos de la familia de los macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos o diaminopirimidinas, incluso encontrándose en ellas nuevos genes de resistencia como *dfrK* o *vgaE* (Vanderhaeghen et al.,

2010). Un rasgo especial de algunas de las cepas SARM CC398 es que pueden presentan un fenotipo de resistencia a lincosaminas disociado de los macrólidos, fenotipo caracterizado por poseer determinantes de resistencia como *vgaA, vgaC, vgaE,* siendo bastante específicos de esta línea genética (Kadlec *et al*., 2010; Argudín *et al*., 2011; Lozano *et al*., 2012). En contraposición, el perfil de virulencia de estas cepas no suele presentar toxinas como la LPV o TSST (Smith et al., 2010), aunque en los últimos años ya han aparecido casos en Europa (Welinder-Olsson *et al*., 2008) y en Asia (Yu et al., 2008) con estos determinantes. Por el contrario, la presencia del gen de adhesión al colágeno (*cna*) ha sido detectado en la mayoría de cepas CC398 (Lozano et al., 2012).

La transmisión de esta línea genética al hombre y su detección aconteció de una manera paralela a la de los animales, encontrándose el SARM CC398 como colonizador (Armand-Lefevre et al., 2005) o como agente etiológico causante de infecciones de diversa gravedad, especialmente en infecciones de piel y tejidos blandos (Voss et al., 2005; Lozano et al., 2011; Rasigade et al., 2012). Se postuló que el estrecho contacto con cerdos u otros animales de granja eran un claro factor de riesgo para la transferencia animal-hombre (Khana et al., 2008; García-Graels et al., 2012; Verkade et al., 2014), especialmente en granjeros o veterinarios, donde se determinó que la prevalencia de esta línea genética era muy superior a poblaciones similares sin contacto animal (Voss et al., 2005). Sin embargo SARM CC398 se ha diseminado rápidamente a ambientes hospitalarios (Verkade et al., 2012; Williamson et al., 2014) y comunitarios (VanCleef et al., 2011), mostrando un amplio rasgo adaptativo y una preocupante facilidad de transmisión hombre-hombre. No obstante algunos autores aseguran que esta variante genética presenta una menor capacidad para transferirse que otros linajes clonales presentes en los hospitales (van Rijen *et al*., 2009; Wassenberg *et al*., 2011). Además, existen recientes casos en los que se ha detectado cepas SARM CC398 en individuos sin contacto estrecho con animales, no conociéndose la fuente de la contaminación (Krziwanek *et al*., 2009) y se comienza a creer que la infección actual por SARM CC398 ya no está tan asociada a simple zoonosis, sino que el clon ya se ha podido establecer de forma endémica en la población (Deiters et al., 2015; Lekkerkerk et al., 2015), aspecto que será analizado en esta tesis.

SARM-AG de la línea genética CC130

En el año 2011, mientras se realizaba un estudio epidemiológico de SARM en muestras de mastitis bovinas y tanques de leche de origen vacuno en Inglaterra, se encontró una cepa (LGA_{251}) que contenía un nuevo determinante de resistencia a meticilina, el $mecA_{LG251}$

(García-Alvarez et al., 2011), posteriormente denominando *mecC* (Paterson et al., 2014). Se determinó que esta cepa estaba adscrita a la línea genética CC130, estrechamente asociada a ganado bovino e implicada en numerosos casos de infecciones en animales. Cabe destacar que hasta la fecha muchas de estas cepas pudieron ser mal identificadas como sensibles a meticilina en los principales controles clínicos o epidemiológicos, dado que eran negativas para el gen *mecA* de la PCR convencional de detección de resistencia a meticilina. No obstante y dada la importancia de la cepa, estudios retrospectivos dataron la aparición de este tipo de SARM ya en 1975, con la detección de la primera cepa implicada en infecciones humanas procedente de un hemocultivo en Dinamarca (Garcia-Alvarez et al., 2011).

La dispersión de este nuevo clon en Europa comienza a ser un hecho destacable, encontrándose cada vez más casos de infecciones en humanos capaces de provocar cuadros clínicos fatales, tanto en el ámbito hospitalario como comunitario (Romero-Gómez et al., 2013; García-Garrote et al., 2014; Cano-García et al., 2014), además de seguir una fuerte tendencia de dispersión en diferentes especies animales en países como Reino Unido, Dinamarca, Alemania o Francia (Paterson et al., 2014). En el caso de España los casos se multiplican, habiéndose encontrando líneas genéticas similares en pequeños mamíferos de vida salvaje y ciervos (Gómez et al., 2014; Gómez et al., 2015), en aguas residuales urbanas (Porrero et al., 2014), en granjas de animales de producción (Ariza-Miquel et al., 2014) y hasta en los ríos cercanos a éstas granjas (Porrero et al., 2014b), lo que evidencia el grave problema que ésta nueva línea genética es capaz de producir por su gran ubicuidad.

Las características moleculares de esta línea genética son muy específicas, conteniendo el gen *mecC* formando parte del SCC*mec* XI, el gen de resistencia a β-lactámicos *blaZ*-SCC*mec* XI y el gen de virulencia *etD2*. No han sido detectados cepas con perfiles de multirresistencia o con perfiles de virulencia más destacados hasta la fecha (García-Alvarez et al., 2011; Paterson et al., 2014).

Otras líneas genéticas SARM-AG

Existen otras líneas genéticas que han sido asociadas a animales. Es el caso del clon CC9, comúnmente aislado de poblaciones porcinas en varios países asiáticos (Cui et al., 2009), aunque más recientemente se ha detectado como agente etiológico de infecciones invasivas en humanos en Francia (Lamamy et al., 2013). Sus rasgos característicos son presentar resistencia a macrólidos y contener el gen de la exfoliatina A (*eta*) (Argudín et al., 2013). Así mismo el clon CC97 ha sido relacionado con poblaciones porcinas (Gómez-Sanz et al., 2010). Otra línea genética de *S. aureus* asociada a animales, casi siempre en su variante sensible a

meticilina, es la CC133, estrechamente relacionada con ungulados y ruminantes, y que porta normalmente el gen *luk-M* (Porrero et al., 2012; Schotter et al., 2012).

9.3.2. SARM asociado a animales de compañía

La estrecha relación que el hombre ha tenido y tiene con sus mascotas (gatos, perros, caballos, etc.) es extrapolable a la creciente interacción que nuestros patógenos naturales comienzan a tener fuera del ámbito humano. Por ello es razonable que cada vez aparezcan más estudios indicadores de una transmisión zoonótica (o antropozoonótica) en ambos sentidos, descubriendo que tanto los SARM-AH como los SARM-AC pueden formar parte de la microbiota animal, encontrándose líneas genéticas citadas anteriormente como CC1, CC5, CC8, CC22 o CC45 en perros, gatos o caballos (Gómez-Sanz et al., 2013; Davis et al., 2014), incluso otros clones asociados tradicionalmente a animales de producción como el CC398 (que ya hemos visto) evidenciando una transmisión cruzada entre animales (de compañía o producción) y el hombre (Vincze et al., 2014; Abdelbary et al., 2014).

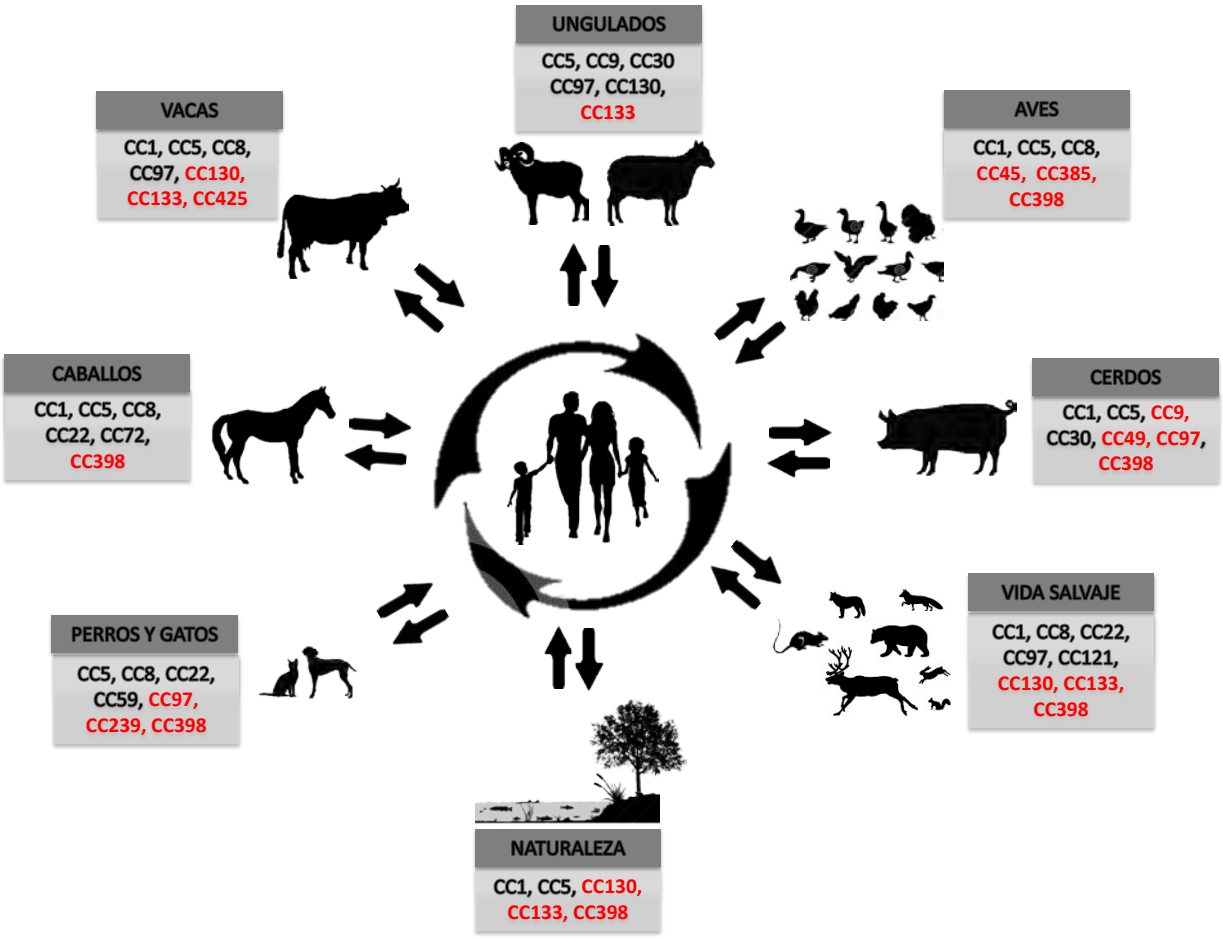


Figura 16. Principales líneas genéticas detectadas en diferentes especies animales con potencial zoonótico en el hombre. (Ilustración propia basada en McCarthy et al., 2012). En rojo se marcan las líneas más prevalentes.

9.4. SARM en la cadena alimentaria

Teniendo en cuenta la gran dispersión de cualquiera de las formas de SARM entre poblaciones humanas y animales, no es de extrañar su aparición en la cadena alimentaria. La contaminación por SARM en los alimentos puede producirse de manera directa, a través de las materias primas procedentes de los propios animales de consumo y sus derivados, o de manera indirecta, en la que los manipuladores de alimentos colonizados pueden actuar como vectores de éste microorganismo, contaminando los productos manufacturados de consumo humano, especialmente aquellos que requieren de mayor elaboración. Los alimentos más frecuentemente relacionados con intoxicaciones por *S. aureus* son productos derivados de aves, carnes poco cocinadas o crudas, o productos de pastelería (Wendlandt et al., 2013). Las intoxicaciones alimentarias por SARM han adquirido un gran interés en los últimos años, gracias a la supervivencia demostrada por este microorganismo en diferentes productos de origen animal (carne, huevos, leche…etc) y su capacidad para excretar enterotoxinas durante su crecimiento en el alimento; estas toxinas serán las responsables de las conocidas toxoinfecciones alimentarias por *S. aureus* (Argudín et al., 2010; Wendlandt et al., 2013).

Las características moleculares de este tipo de aislados no difieren de los aislados asociados a ambientes hospitalarios (AH), asociados a la comunidad (AC) o los asociados a animales en la ganadería (AG), ya que cualquiera de las líneas genéticas descritas anteriormente pueden aparecer como agente etiológico de toxoinfecciones alimentarias, de hecho, los alimentos pueden servir como vehículos de las diferentes líneas genéticas de este microorganismo (DeLeo and Chambers 2009; Pu et al., 2009; deBoer et al., 2009; Ogata et al., 2014). Las prevalencias encontradas varían mucho de una región a otra del mundo y del producto testado. En el caso de productos cárnicos, las tasas de contaminación por SASM varían en un amplio rango, 16-45% pero descienden considerablemente si solo nos ceñimos a contaminación por SARM con valores muy variables como se muestran en la **Tabla 6** (Wendlandt et al., 2013).

Tabla 6. Tasas de contaminación alimentaria por SARM. (*Muestreos no homogeneizados, en el caso de Asia los estudios son más escasos que en Europa, EEUU o Canadá).

Origen	**EUROPA***	**NORTEAMÉRICA***	**ASIA***
Cerdo	2-12%	3-10%	1-4%
Ternera o Res	0-15%	0-7%	1-5%
Leche	7-9%	4%	2,7%
Aves de corral	8-16%	<2%	<1%

Las diferentes metodologías utilizadas y el número de estudios realizados en cada área pueden sesgar mucho los resultados, por lo que tomamos los resultados como tendencias, entre las que se puede destacar una mayor tasa de contaminación por SARM en países europeos que en países asiáticos. En este caso, las tasas reportadas en Canadá y EEUU caen en valores más bajos. Por otro lado, las diferentes líneas genéticas detectadas en alimentos a nivel mundial se muestran en la **figura 17**.

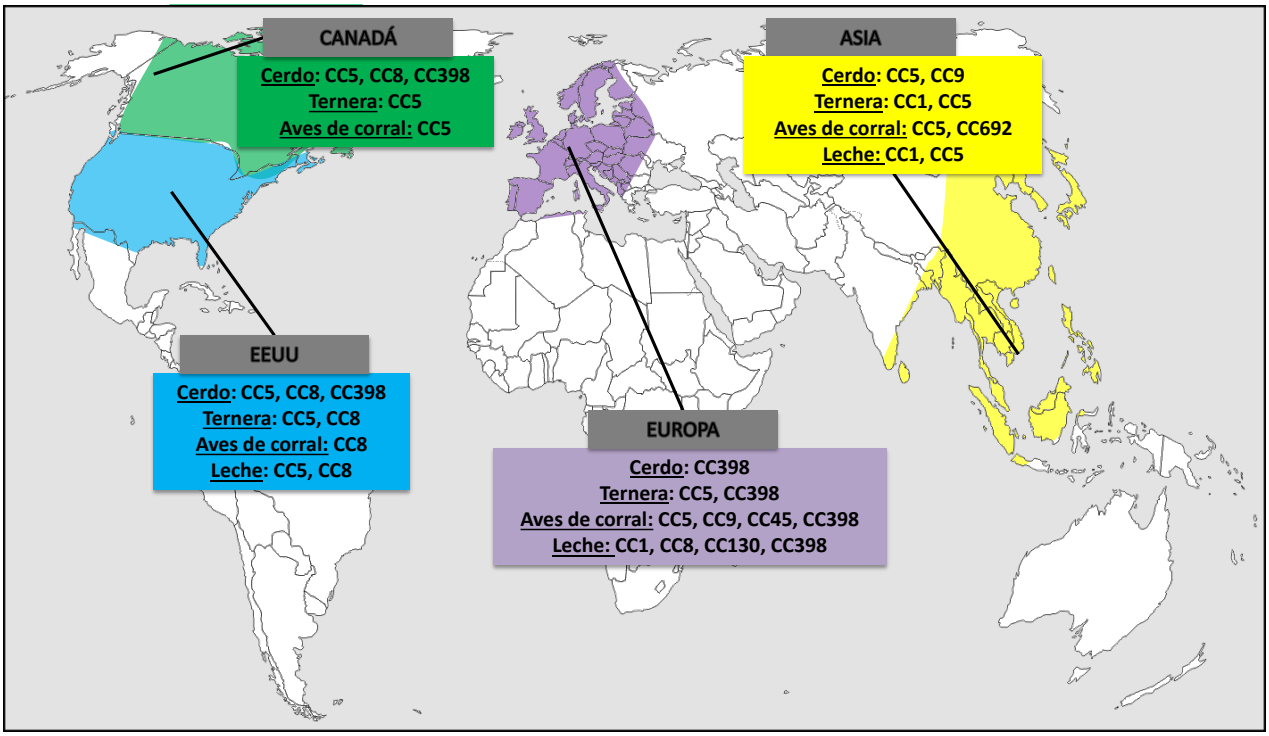


Figura 17. Principales líneas genéticas detectadas en diferentes alimentos de orígen animal de consumo humano (Ilustración propia basada en Wendlandt et al., 2013).

A la vista de las notables tasas de contaminación por SARM detectadas hasta la fecha en diferentes productos alimentarios y teniendo en cuenta la dispersión mundial de las diferentes líneas genéticas circulantes en la cadena alimentaria, se evidencia la necesidad de un mayor control por parte de las autoridades, primero para salvaguardar la propia seguridad de los manipuladores de alimentos y de los consumidores y, segundo, para evitar que la cadena alimentaria se establezca como un mecanismo de transmisión de clones de SASM o SARM que pueden interactuar con las diferentes poblaciones conocidas de este microorganismo, con las implicaciones económicas que puedan conllevar. Son varios los casos reportados a nivel mundial de toxinfecciones alimentarias producidas por SARM (Kluytmans *et al*., 1995; Jones *et al*., 2002; Crago et al., 2012).

10. PATOGÉNESIS DE SARM EN MODELOS ANIMALES. ENSAYO DE SUPERVIVIENCIA DE *Staphylococcus aureus* Vs *Caenorhabditis elegans*

La gran variabilidad genética de *S. aureus* por la adquisición de diferentes EGMs, la integración de diferentes SCC*mec*, la transducción de diferentes factores de virulencia a través de fagos y el constante aporte de material genético nuevo, como determinantes de resistencia, a través de la conjugación y/o transformación, hacen de este microorganismo uno de los patógenos más preparados para la colonización, infección y establecimiento en el hombre. Pero es esta variabilidad genética la que nos hace preguntarnos si su patogénesis se debe al conjunto sinérgico de sus propiedades de resistencia y virulencia o si alguno de estos componentes tiene mayor peso en su capacidad para generar cuadros clínicos de gravedad. Es por ello cuando surge la necesidad de realizar estudios "in vivo" para poder determinar cuál de los elementos genéticos de *S. aureus* puede resultar clave en una infección por este microorganismo. Así surge la necesidad de encontrar un modelo animal que sea simple, con una fisiología básica parecida al hombre y cuyos resultados sean extrapolables al ámbito humano. Hablamos entonces del modelo animal, previamente avalado, de *C. elegans.*

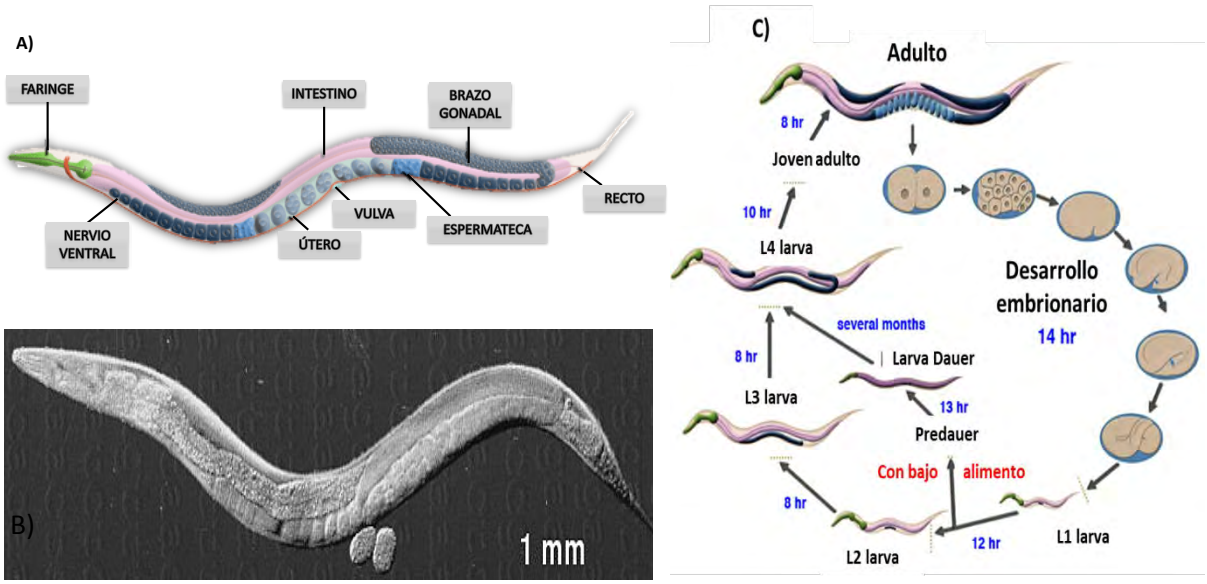


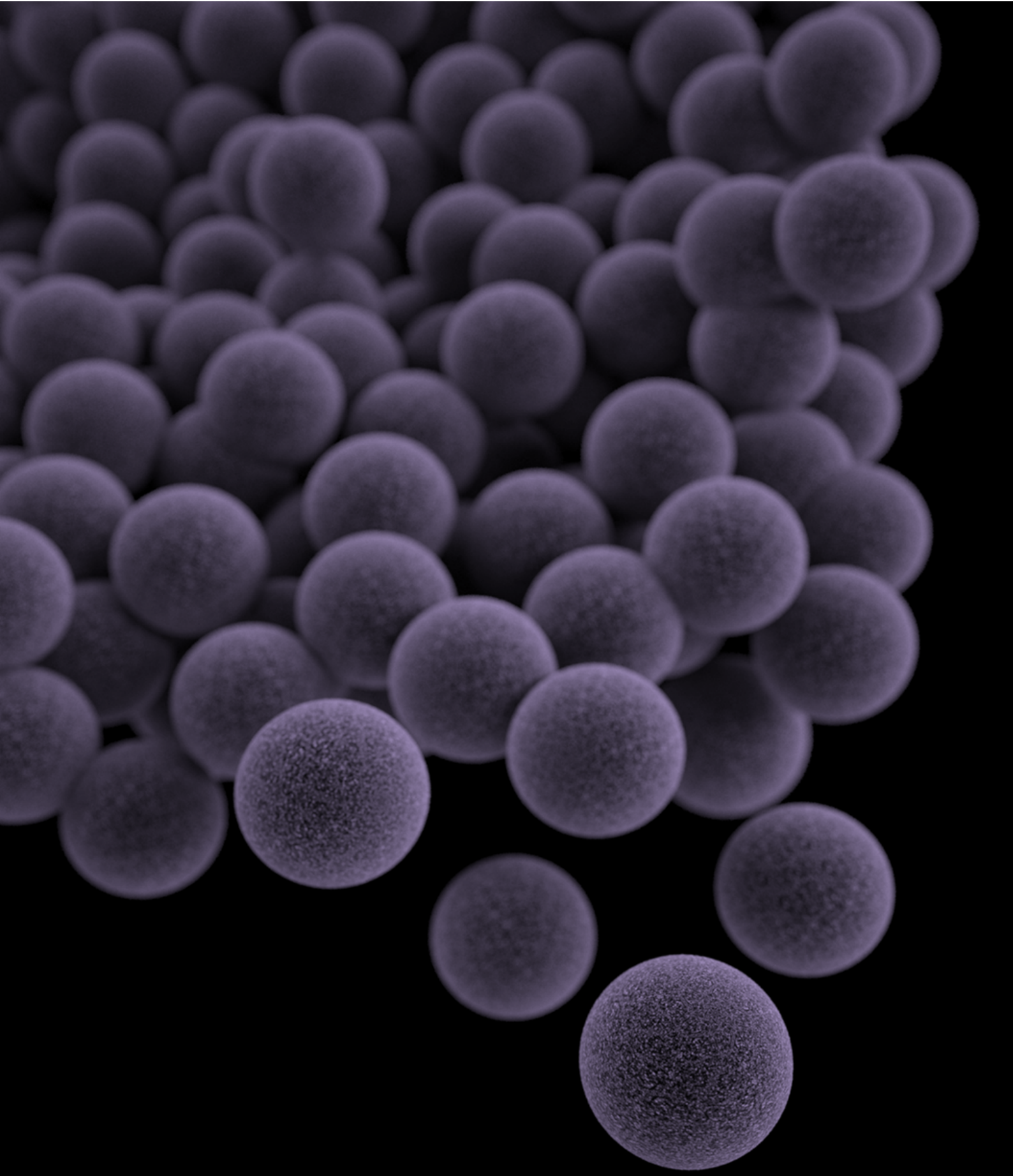
Figura 18. A) Anatomía general de *C. elegans* (Simon Fraser University) B) *C. elegans* al microscopio electrónico . C) Ciclo biológico de *C. elegans*

C. elegans es un nematodo de la familia Rhabditidae (Orden Rhabditida), que mide aproximadamente 1 mm de longitud. Se trata de un organismo transparente formado por 959 células, con una fisiología simple y con un sistema nervioso, digestivo y reproductor bien definido. Tiene reproducción partenogenética y bajo ciertas circunstancias ambientales,

reproducción sexual. Su ciclo biológico comprende 4 estadios fundamentales: 1) huevo, donde desarrolla su fase embrionaria; 2) larva de primer y segundo estadio en el huevo y 3) juvenil de vida libre (larva de tercer estadio); larva de cuarto estadio (preadulto o inmaduro todavía no es competente reproductivamente) y 4) adulto, con capacidad de poner hasta 300 huevos (**Figura 18**). En condiciones óptimas todas las fases biológicas se dan entre 7 y 8 días. Su ciclo vital raramente supera las 3 semanas y requiere de muy poco mantenimiento en el laboratorio. Este nematodo en condiciones ambientalmente adversas entra en fase "larva dauer" hasta que las condiciones son favorables para retomar su ciclo biológico (Navas, 2014). Todo ello lo hace un excelente modelo animal (Rodríguez et al., 2013).

Muchos estudios en microbiología avalan la idoneidad de *C. elegans* como modelo animal para realizar ensayos de supervivencia o muerte (Ruiz-Diez et al., 2003; Bae et al., 2004; Begun et al., 2005; Navas et al., 2007; Wu et al., 2012). En el caso concreto de *S. aureus*, estudios previos postulan la posibilidad de que la patogénesis del microorganismo en el hombre no sólo se deba a uno u otro factor de virulencia, sino que la línea genética, los diferentes perfiles de sensibilidad o resistencia a meticilina, y el origen tradicional de algunos aislados de *S. aureus* (clones hospitalarios, comunitarios o asociados a animales) podrían ser determinantes en el desarrollo de su patogenia (Day et al., 2012).

En estos ensayos de una duración de entre 24h-120h (Day et al., 2012; Wu et al., 2013), se observó que clones como CC1 o CC8 (tradicionalmente asociados a SARM-AC en Norteamérica) producían una actividad nematicida bastante superior que otros clones como CC5, CC30, CC80 o CC88 (asociados a aislados SARM-AH y SARM-AC en Europa). A su vez, dentro de una actividad nematicida más moderada, los clones CC80 y CC88 (SARM-AC) producían una mayor tasa de muerte que los clones CC5 y CC30 (SARM-AH). En lo relativo a la función de los factores de virulencia en la capacidad nematicida de *S. aureus*, se determinó que la toxina LPV o TSST por sí mismas no generan mayores tasas de muerte en los nematodos, sino que su actividad nematicida está mayormente asociada al perfil genético de los aislados que las contengan (Wu et al., 2013).



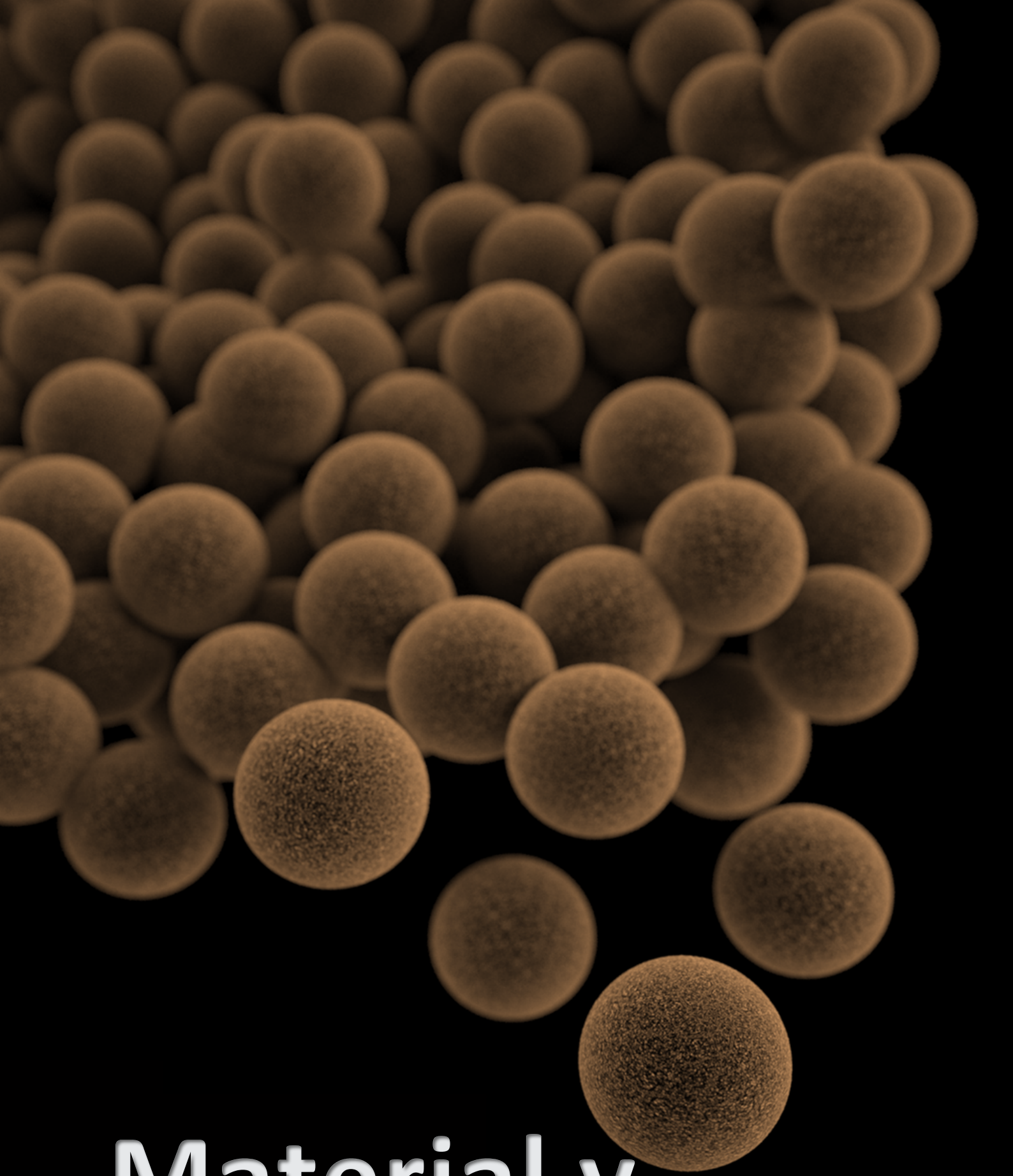
Objetivos

“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”

Louis Pasteur (Químico y Microbiólogo)

OBJETIVOS

1. Caracterización molecular y estudio de la estructura poblacional de aislados clínicos de *S. aureus* implicados en diversas patologías.
2. Detección y caracterización de aislados clínicos SARM del linaje CC398 y análisis del contacto con animales de granja como posible factor de riesgo para su implicación en colonización y/o infección.
3. Determinación del estado de portador y dinámica de colonización por *S. aureus* en individuos sanos con diferente grado de contacto animal y análisis de las líneas genéticas asociadas.
4. Estudio de la posible implicación de la lactancia materna en la transferencia e implantación de *S. aureus* en la microbiota intestinal del recién nacido.
5. Estudio de la prevalencia y caracterización molecular de *S. aureus* y SARM en alimentos.
6. Caracterización de marcadores de adaptación al huésped relacionados con los genes IEC en cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes y líneas genéticas.
7. Análisis de la patogenicidad de diferentes líneas genéticas de *S. aureus,* tanto SASM como SARM, en el modelo animal *C. elegans.*



Material y Métodos

“Tened paciencia y tendréis ciencia”

Baltasar Gracián (Escritor)

1. CEPAS ESTUDIADAS

1.1. AISLAMIENTOS CLÍNICOS

1.1.1. Cepas SARM de hemocultivos del Hospital Royo Villanova de Zaragoza (Hospital RV-Z)

Durante el período 2007/2011 se obtuvieron un total de 111 aislados de *S. aureus* procedentes de hemocultivos en el Hospital RV-Z. De todos ellos, se seleccionaron 39 por presentar un fenotipo SARM y se incluyeron en esta tesis (2007, 6 aislados; 2008, 7 aislados; 2009, 7 aislados; 2010, 11 aislados; y 2011, 8 aislados).

1.1.2. Cepas SARM de diversas muestras clínicas del en el Hospital RV-Z (excluyendo hemocultivos)

Durante el período marzo-2010/agosto-2012 se aislaron 105 cepas SARM en el Hospital RV-Z, y fueron remitidos a la Universidad de La Rioja para su estudio en esta tesis. En este caso, el criterio de selección excluyó a los aislados procedentes de hemocultivos y se añadieron al estudio, además de aislados con significación clínica, aislados procedentes de muestras de control epidemiológico. El origen de las 105 cepas SARM fue el siguiente (número de cepas): frotis nasal-axilar-inguinal (46), piel y partes blandas (34), respiratorio (15), orina (5) y herida quirúrgica (5) (**Figura 19**).

Todas las cepas procedentes del Hospital RV-Z fueron remitidas por la Dra. Carmen Aspiroz y su posterior caracterización se llevó a cabo en la Universidad de La Rioja.

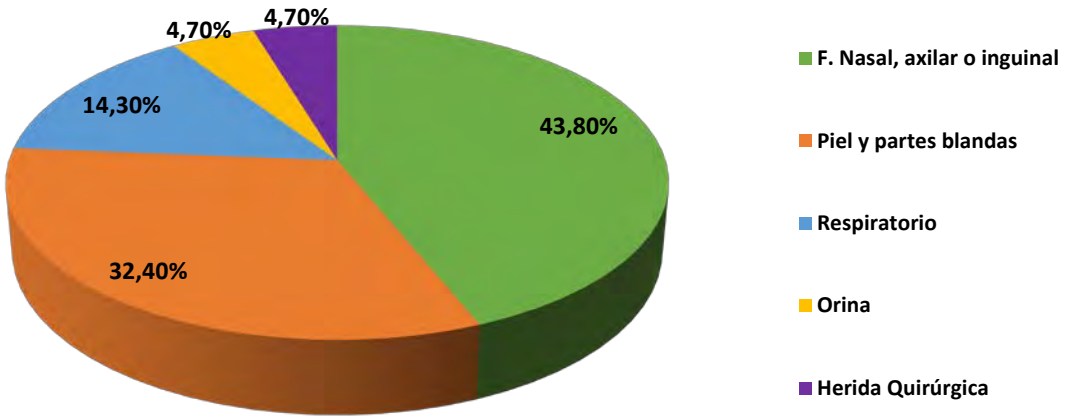


Figura 19. Origen de las 105 cepas SARM obtenidas durante el período 2010-2012 en el Hospital RV-Z (en esta serie se excluyen los aislados de hemocultivos).

1.1.3. Cepas SARM-TET^R del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza (Hospital UMS-Z)

Durante los años 2011 y 2012 se aislaron 749 cepas SARM procedentes de 749 pacientes diferentes del Hospital UMS-Z, representando un 22,5% del total de aislados de *S. aureus* en dicho hospital durante el periodo citado. De las 749 cepas SARM, 98 de ellas presentaban, además de resistencia a meticilina, resistencia a tetraciclina, representando un 13,1% del total de aislados SARM. Las 98 cepas SARM-TET^R fueron remitidas a la Universidad de La Rioja para su estudio, gracias a la colaboración con el Dr. Antonio Rezusta, Facultativo de Microbiología de dicho hospital. El criterio de selección utilizado fue la resistencia a tetraciclina, con el fin de determinar si las cepas con este fenotipo de resistencia pertenecían a la línea genética ST398. Además, gracias a un estudio epidemiológico paralelo, se trató de determinar la correlación entre el contacto con animales de los pacientes y la prevalencia de la línea ST398 entre los aislados estudiados y se establecieron tres grupos: A) 25 pacientes con contacto con animales de granja; B) 42 pacientes sin contacto con animales de granja; C) 31 pacientes en los que no se pudieron conseguir datos al respecto. El 40,8% de los aislados SARM-TET^R eran procedentes de muestras de colonización, mientras que el 59,2% de los aislados procedían de aislados con significancia clínica. El origen de las 98 cepas SARM-TET^R fue el siguiente (número de cepas): frotis nasal (40), piel y partes blandas (35), aparato respiratorio (15), aparato urogenital (7) y sangre (1) (**Figura 20**).

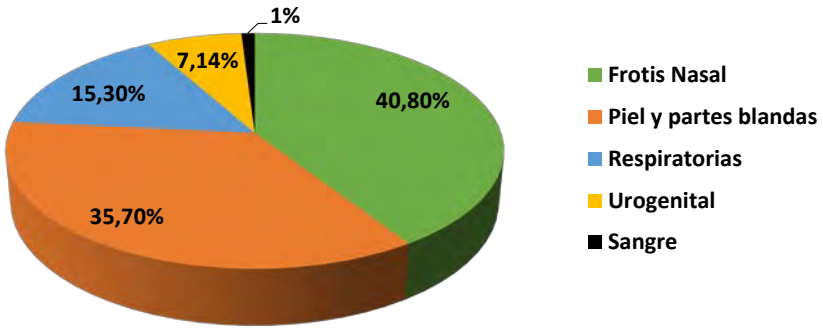


Figura 20. Origen de los 98 aislados SARM-TET^R obtenidos en el Hospital UMS-Z

1.1.4. Cepas *S. aureus* de pacientes pediátricos con dermatitis atópica (DA)

Se seleccionaron 40 cepas *S. aureus* procedentes de 35 pacientes pediátricos con DA, analizados paralelamente en el Hospital Niño Jesús de Madrid y en el Hospital San Jorge de

Huesca. Este estudio fue realizado gracias a la colaboración de la Dra. Carmen Aspiroz y la Dra. Yolanda Gilaberte. De las 40 cepas del estudio, 26 de ellas procedían de muestras de lesiones de piel y las otras 14 cepas fueron aisladas de frotis nasales (**Figura 21**). Mediante el uso del parámetro "Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) score", se pudo determinar la severidad de los diferentes procesos de dermatitis atópica en los 35 pacientes testados, lo que permitió catalogar a los pacientes en 3 grupos: proceso severo (SCORAD ≥ 40; 13 pacientes), proceso moderado (SCORAD 15-39; 20 pacientes) y proceso leve (SCORAD < 15; 2 pacientes) (**Figura 22**).

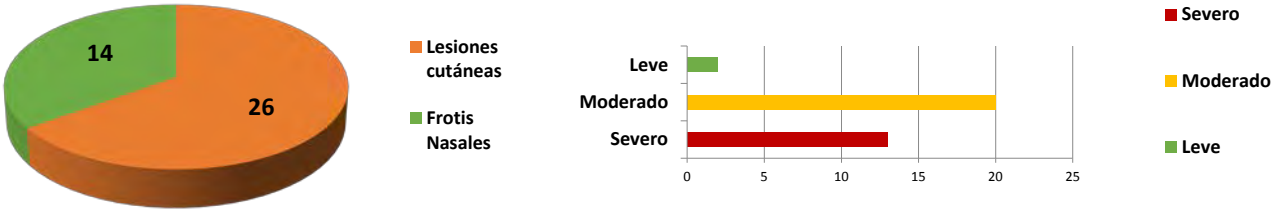


Figura 21. Origen de los 40 aislados de pacientes con DA (dcha). **Figura 22.** Nº pacientes DA y tipo SCORAD (izda)

1.2. CASOS CLÍNICOS DE INTERÉS

Durante un período de 2 años (Septiembre 2012 a Septiembre 2014) se estudiaron otras cepas de *S. aureus* procedentes de pacientes del Hospital RV-Z, siendo alguno de ellos de especial interés por el cuadro clínico presentado o por el entorno laboral en el que se encontraba el paciente. El trabajo se realizó gracias a la colaboración con la Dra. C. Aspiroz, facultativo de Microbiología de dicho hospital. En este intervalo de tiempo se detectaron 5 casos clínicos distintos causados por cepas SARM o SASM de distintas variantes genéticas. Las muestras clínicas fueron procesadas en el Hospital RV-Z y las cepas aisladas fueron posteriormente remitidas a la Universidad de La Rioja, donde fueron caracterizadas e incluidas en esta tesis.

1.2.1. Forunculosis recurrente familiar.

Caso de un varón que mostraba un absceso doloroso en el primer dedo de la mano derecha. Se realizó drenaje de la lesión y se pautó tratamiento con amoxicilina-clavulánico. Regresó al día siguiente con aparición de otros abscesos en diferentes localizaciones. Tras nuevo drenaje se pautó cloxacilina. Seis días más tarde presentó malestar general con astenia, picos febriles de hasta 39ºC y lesiones abscesificadas y ulceradas en el muslo, pierna y abdomen. Se realizó cultivo de las lesiones y se decidió pautar levofloxacino ante la falta de

respuesta al tratamiento previo. En el cultivo se aisló SARM, cepa que fue incluida en el estudio (**Tabla 7**). Al paciente se le pautó doxiciclina durante 10 días, mupirocina nasal durante 5 días y lavados con jabón de clorhexidina, observándose mejoría clínica. Además de las 7 cepas SARM obtenidas del paciente (5 procedentes de frotis epidemiológicos y 2 procedentes de abscesos), se realizó un estudio de colonización paralelo a la familia conviviente del paciente, encontrándose otras 7 cepas SARM, de las cuales 5 fueron incluidas en el estudio (4 procedentes de la hija y 1 procedente de la mujer del paciente) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Cepas SARM totales aisladas del paciente y de sus familiares en el caso clínico de la forunculosis recurrente familiar.

Caso clínico	Cepa	Persona muestreada	Tipo de muestra	Fecha aislamiento
Forunculosis	C6319	Paciente	Absceso muslo	26 de febrero 2013
	C6320	Paciente	Nasal	28 de febrero 2013
	C6321	Paciente	Frotis Inguinal	28 de febrero 2013
	C6322	Paciente	Absceso gemelo	28 de febrero 2013
	C6323	Mujer	Nasal	1 de marzo 2013
	C6324	Hija	Nasal	1 de marzo 2013
	C6328	Hija	Absceso glúteo	8 de marzo 2013
	C6329	Paciente	Nasal	18 de marzo 2013
	C6400	Hija	Nasal	9 de abril 2013
	C6402	Hija	Nasal	2 de mayo 2013
	C6401	Paciente	Nasal	8 de mayo 2013
	C6403	Paciente	Frotis Inguinal	8 de mayo 2013

1.2.2.- Casos clínicos relacionados con la línea ST398

Los 4 casos clínicos que se presentan fueron detectados en el Hospital RV-Z y las cepas fueron estudiadas gracias a la colaboración de la Dra. Carmen Aspiroz.

Caso clínico 1. Exgranjero de explotación porcina con contacto intermitente actual con la granja

Paciente de 57 años que trabajó en el pasado en una granja de cerdos y en la actualidad ayuda a su hijo en dicha granja. Al tiempo de la admisión hospitalaria se le realizó un frotis nasal como control epidemiológico en el que se aisló una cepa SASM de la línea ST398. Posteriormente se procedió a la realización de un estudio epidemiológico entre los miembros de su familia más cercana, encontrándose un total de 7 aislados de *S. aureus* (SASM y SARM) en 4 de sus familiares (mujer, hijo, hermana y nieto) (**Tabla 8**).

Ante la sospecha del posible origen animal de las cepas SARM/SASM obtenidas de los pacientes y sus familiares en este caso clínico, se procedió a estudiar la prevalencia de animales portadores de SARM en la explotación ganadera porcina relacionada con los integrantes del caso. Para ello se tomaron muestras nasales o cutáneas de 13 cerdos con la colaboración de los veterinarios que atiendían la granja y los hisopos fueron remitidos a la Universidad de La Rioja, donde fueron procesados siguiendo la metodología detallada más adelante para el aislamiento de SARM o SASM. Se aislaron cepas SARM en 6 de los 13 cerdos analizados. Posteriormente se llevó a cabo la caracterizaron genética de las cepas aisladas con el fin de determinar la posible transferencia de SARM y/o SASM del animal al hombre.

Tabla 8. Cepas SARM aisladas de muestras nasales y cutáneas del paciente, de sus familiares y los cerdos de la granja relacionada con los integrantes del caso clínico 1.

Origen	Cepa	Otros datos	Fecha aislamiento
Humanos	C6411	Paciente	Mayo 2013
	C6541	Nieto	Junio 2013
	C6542	Nieto	Junio 2013
	C6543	Mujer	Junio 2013
	C6544	Mujer	Junio 2013
	C6545	Hijo	Junio 2013
	C6546	Hermana	Junio 2013
Cerdos	C6547	Cerdo 3	Verano 2013
	C6548	Cerdo 6	Verano 2013
	C6550	Cerdo 10	Verano 2013
	C6552	Cerdo 13	Verano 2013
	C6586	Cerdo 1	Verano 2013
	C6587	Cerdo 11	Verano 2013

Caso clínico 2. Camionero de ganado porcino en activo

Paciente que ingresa en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del hospital por un problema coronario y no infeccioso, al que se le realiza un control epidemiológico a través de un frotis nasal que resulta positivo para *S. aureus* (ST398) recogiéndose un total de 2 cepas diferentes (**Tabla 9**). Reporta que su actividad profesional consiste en el transporte de ganado porcino (camionero), a la que lleva dedicándose los últimos años. Resultó ser portador asintomático de SARM.

Caso clínico 3. Exgranjero con patología urológica

Paciente de 77 años que ingresa en el hospital por una patología urológica, por lo que se le realiza un cultivo microbiológico de una muestra de orina, que resulta positiva para *S. aureus* (línea genética ST398) (**Tabla 9**). El paciente, ya jubilado, que refiere haber trabajado en una explotación bovina hace más de 20 años y no haber tenido contacto con este medio en los sucesivos años.

Caso clínico 4. Exgranjero de hace más de 20 años

Paciente de 84 años que ingresa en el hospital con patología respiratoria, por lo que se le realiza un cultivo microbiológico de una muestra de esputo y otra muestra de origen nasal. Se aísla la misma cepa *S. aureus* en ambas localizaciones (línea ST398) (**Tabla 9**). El paciente, ya jubilado, reporta haber trabajado en una granja de vacas y de pollos hace más de 20 años, y no haber tenido contacto con este medio en los sucesivos años.

Tabla 9. Cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes muestras con significancia clínica y epidemiológica de los pacientes de los casos clínicos 2-4 relacionados con la línea genética ST398

Caso clínico	Cepa	Persona muestreada	Tipo de muestra	Fecha aislamiento
2	C6828	Paciente	Frotis Nasal	10 de Enero 2014
	C6829	Paciente		
3	C7241	Paciente	Orina	16 de Abril 2014
4	C7243	Paciente	Frotis Nasal	30 de Abril 2014

1.3. MUESTRAS FECALES DE PERSONAS SANAS

Se recogieron muestras fecales de 100 individuos voluntarios sanos (53 mujeres y 47 hombres, rango de edad: 2-89 años) durante el periodo septiembre de 2010 y marzo de 2011, en la Comunidad Autónoma de La Rioja. Los criterios de selección de los individuos fueron los siguientes: a) no haber tenido contacto con el sistema sanitario en los 3 meses previos a la toma de muestras; b) no haber tomado ningún antibiótico en los 3 meses previos a la toma de la muestra. Todos los individuos (o sus tutores) dieron su consentimiento informado escrito para la participación en el estudio.

1.4. MUESTRAS NASALES Y CUTÁNEAS DE PERSONAS CON DIFERENTE GRADO DE CONTACTO CON ANIMALES DE GRANJA

Se llevó a cabo un estudio longitudinal a lo largo de un año, de colonización nasal o cutánea por SASM/SARM, en 11 miembros de una familia de granjeros que presentaban diferente grado de contacto con los animales de la granja. Se recogieron 31 muestras nasales y

9 muestras cutáneas de pequeñas lesiones de los 11 individuos en intervalos de 6 meses (abril 2013, octubre 2013 y abril 2014). Los 11 individuos pertenecían a una misma familia de granjeros y todos dieron su consentimiento escrito para la participación en el estudio. Los criterios de selección de los individuos fueron los mismos que en el anterior epígrafe: no haber tenido contacto con el sistema sanitario, ni haber tomado antibiótico durante el estudio. Los individuos se distribuyeron en 3 grupos atendiendo al grado de contacto animal: a) Contacto alto, tres individuos eran granjeros y trabajaban continuamente en la granja; b) Contacto medio, tres individuos vivían en una casa dentro del recinto de la granja y trabajaban esporádicamente en ella; c) Contacto bajo, 5 individuos convivían con los individuos que trabajaban continua o esporádicamente en la granja. La edad de los individuos estuvo comprendida entre los 26-61 años, siendo el 45% hombres y el 55% mujeres.

1.5. MUESTRAS DE *S. aureus* DE MUESTRAS FECALES DE RECIÉN NACIDOS Y DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA DE SUS RESPECTIVAS MADRES

Gracias a la colaboración con el Prof. J. M. Rodríguez de la Universidad Complutense de Madrid y con los facultativos del Hospital Juan XXIII de Tarragona, se llevó a cabo un estudio multicéntrico, en el que se seleccionaron 41 cepas de *S. aureus* procedentes de 21 parejas de madres sanas y de sus correspondientes bebes lactantes. El criterio de selección de los casos, y por consiguiente de las cepas, fueron los siguientes: a) mujeres sanas con un embarazo normal y completo; b) parto vaginal; c) ausencia de problemas perinatales tanto del lactante como de la mujer, incluida la mastitis. Las muestras, en ambos casos, fueron tomadas de manera paralela a los 7, 14 y 35 días después del nacimiento. Del total de cepas, 16 fueron aisladas de leche materna y 25 fueron aisladas de muestras fecales de recién nacidos.

1.6. MUESTRAS DE ALIMENTOS

Se recogieron un total de 100 muestras cárnicas durante el período 2011-2012 procedentes de pequeñas carnicerías locales (53 muestras) y grandes superficies comerciales (47 muestras) de La Rioja. El origen de las muestras cárnicas fue el siguiente: 34 de cerdo, 31 de pollo, 15 de pavo, 15 de ternera y 5 de cordero (**Figura 23**).

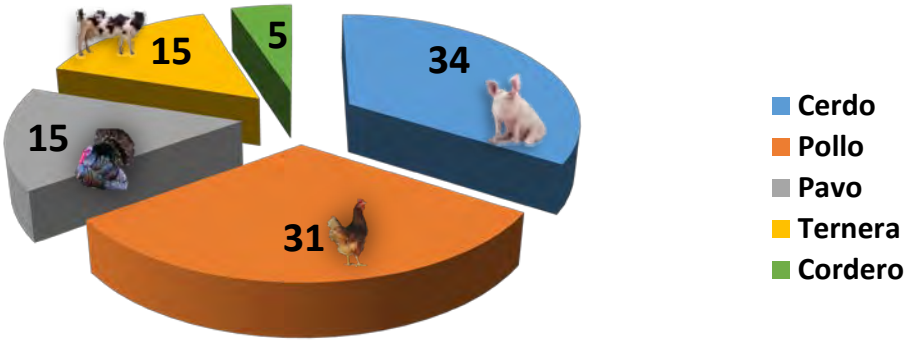


Figura 23. Distribución de las muestras recogidas en función de su origen animal

2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

2.1. Muestras nasales, cutáneas o fecales de todas las personas sanas muestreadas y de los cerdos del caso clínico 1

Las muestras fueron recogidas mediante hisopado nasal o cutáneo de los voluntarios sanos y de los cerdos de la granja del caso clínico 1. En el caso de las muestras fecales, los individuos sanos participantes recogieron una pequeña porción de heces tras la deposición, con una torunda de algodón estéril que fue mantenida en refrigeración hasta su estudio en la UR. Los hisopos con las muestras fecales fueron homogeneizados en 3 ml de solución salina estéril y posteriormente 100 µl fueron inoculados en medio BHI caldo (Difco) con 6,5% de cloruro sódico (medio de enriquecimiento selectivo para *Staphylococcus*). Los hisopos con las muestras nasales o cutáneas fueron inoculados directamente en el mismo medio de enriquecimiento. Se incubaron durante 24/36 h a 37ºC. En aquellos casos en los que se evidenció turbidez en el medio de enriquecimiento, se procedió a sembrar 200 µl de la suspensión en placas de medio ORSAB (OXOID) suplementado con 2 mg/L de oxacilina, para el aislamiento de SARM. Del mismo modo, se sembraron 100 µl en placas MSA (BD) para el aislamiento de *S. aureus.* Se incubaron ambas placas durante 24/48 h a 37ºC. En aquellos casos en los que se detectó crecimiento positivo, se aislaron dos colonias por placa con apariencia de *S. aureus* para su posterior identificación y estudio (**Figura 24**).

2.2. Muestras procedentes de alimentos

Para la detección y aislamiento de *S. aureus* o más específicamente de SARM a partir de los alimentos, se pesó 0,3 g de cada muestra y se homogeneizaron en 3 mL de solución salina estéril. El resto del protocolo fue el mismo que se indica en el párrafo anterior (**Figura 24**).

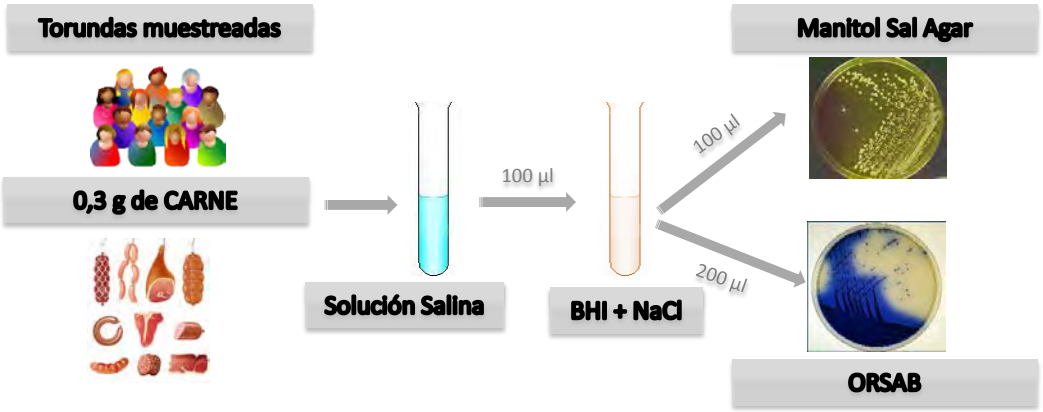


Figura 24. Método microbiológico de aislamiento de *S. aureus* y de SARM

3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA

Las cepas aisladas de muestras nasales, cutáneas y fecales de los individuos sanos, así como de las muestras de alimentos y las muestras de animales fueron identificadas por la tinción de Gram, la reacción de la catalasa y la prueba de la DNasa. Se seleccionaron las bacterias con morfología de cocos Gram positivos con morfología compatible con *Staphylococcus,* catalasa positivo y DNAsa positivo (**Figura 25**). La identificación fue posteriormente confirmada mediante técnicas moleculares, en concreto mediante la PCR especie-especifica del gen *nuc* (ver apartado 8).

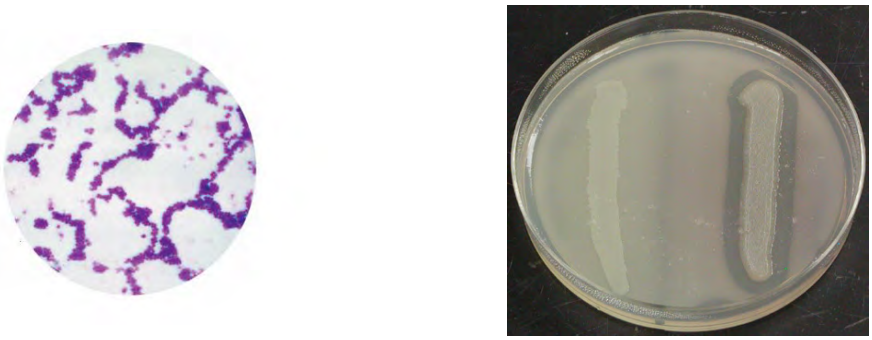


Figura 25. Observación microscópica de los cocos gram positivos y placa de DNasa tras la adición del ácido chlorhídrico.

4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

4.1. Método de difusión por disco o antibiograma.

Se utilizó el método de difusión por disco para estudiar la sensibilidad a los siguientes antibióticos: penicilina, oxacilina, cefoxitina, tetraciclina, eritromicina, lincomicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, estreptomicina, vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, mupirocina, ciprofloxacino y ácido fusídico

Para realizar esta técnica, se partió de un cultivo bacteriano en medio sólido (BHI agar, DIFCO) incubado durante 24 h a 37ºC. Posteriormente se preparó una suspensión de bacterias de una concentración 0,5 McFarland que se extendió, con ayuda de una torunda de algodón estéril, sobre placas de Müeller-Hinton (Difco), colocándose seguidamente los discos de antibiótico comerciales con una separación aproximada de 1 cm. Las placas se incubaron a 37ºC durante 24 horas. Tras la incubación se midió el halo de inhibición obtenido para cada antimicrobiano. Los resultados obtenidos se interpretaron siguiendo los criterios del CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, 2014), EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2014) y en el caso de algunos antibióticos no considerados en el CLSI o EUCAST se utilizaron los puntos de corte establecidos en otras fuentes [Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie (CA-SFM)] (**Tablas 10 y 11**).

Tabla 10. Carga de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por el CLSI o EUCAST para *S. aureus*.

Antibiótico	**Carga (µg)**	**Halo de inhibición (mm)**			**Ref**
		R	**I**	**S**	
Penicilina (PEN)	10 unidades	≤28	-	≥29	CLSI
Oxacilina (OXA)*	1	≤10	11-12	≥13	CLSI
Cefoxitina (FOX)	30	≤21	-	≥22	CLSI
Vancomicina (VAN)*	30	-	-	≥15	CLSI
Gentamicina (GEN)	10	≤12	13-14	≥15	CLSI
Kanamicina (KAN)	30	≤13	14-17	≥18	CLSI
Tobramicina (TOB)	10	≤12	13-14	≥15	CLSI
Tetraciclina (TET)	30	≤14	15-18	≥19	CLSI
Ciprofloxacina (CIP)	5	≤15	16-20	≥21	CLSI
Eritromicina (ERI)	15	≤13	14-17	≥18	CLSI
Clindamicina (CLI)	2	≤14	15-20	≥21	CLSI
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	CLSI
Cloranfenicol (CLO)	30	≤12	13-17	≥18	CLSI
Mupirocina (MUP)	200	<18		≥30	EUCAST

Tabla 11. Carga de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por el Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie (CA-SFM) para *Staphylococcus* spp

Antibiótico	Carga (µg)	Halo de inhibición (mm)		
		R	I	S
Estreptomicina (STR)	10 unidades	<13	-	≥15
Ácido fusídico (FUS)	10	<19	-	≥23
Lincomicina (LIN)	15	<17	-	≥21

Detección de resistencia inducible a clindamicina

Para la detección del fenotipo iMLSB (resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y streptograminas B) se realizó el test del doble disco (D-test) (CLSI, 2014). Para ello se emplearon discos de eritromicina y clindamicina y se colocaron a una distancia de 15-20 mm. Si la cepa presentaba este fenotipo, aparecía un achatamiento del halo de inhibición:

Figura 26. Cepa con resistencia inducible a la clindamicina (D-test positivo).

4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por dilución en agar

La CMI de los antibióticos oxacilina y cefoxitina se determinó por el método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2014). Como cepa control se empleó *S. aureus* ATCC 29213 y el resultado se interpretó según los criterios del CLSI 2014 (**Tabla 12**).

Tabla 12. Criterios para los rangos de resistencia (R), resistencia intermedia (I) y sensibilidad (S) utilizados en este estudio. (CLSI. 2014)

Antibiótico	CMI (µg/mL)			Referencia
	R	I	S	
Oxacilina (OXA)	≤2	-	≥4	CLSI
Cefoxitina (FOX)	≤4	-	≥8	CLSI

5. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE LAS CEPAS

El método utilizado para la extracción del ADN de las cepas aisladas, con el fin de realizar su caracterización molecular, fue el método de extracción con lisostafina y proteinasa K, como se detalla a continuación:

1. Se incubaron las cepas en BHI agar (Difco) durante 24 horas a 37ºC.
2. Se suspendió una colonia aislada en 45 µL de agua MiliQ estéril (Braun) con 5 µL de lisostafina (3000 U/mL).
3. Se vorteó la mezcla y se incubó 10 min a 37ºC.
4. Tras ese tiempo se añadieron 45 µL de agua MiliQ estéril (Braun), 5 µL de proteinasa K (2 mg/ml) y 150 µL de Tris-HCl (0,1 M, pH 8).
5. Se vorteó de nuevo y se incubó otros 10 min a 60ºC.
6. Posteriormente, se hirvió 5 min a 100ºC, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 3 min y se almacenó a 4ºC.

Cuantificación del ADN para optimización de pruebas moleculares (PCR)

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó mediante un espectofotómetro y el programa informático de cuantificación utilizado fue el NANO-DROP. Este programa determina la curva de absorbancia del ADN a 260 nm, lo que nos proporciona la concentración de nuestra muestra. Por otro lado, la pureza se obtiene por la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Una preparación pura de ADN presenta un cociente entre 1,8 y 2,0.

6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es amplificar un fragmento de ADN particular, delimitado por un par de cebadores (F: forward y R: reverse). En esta tesis, esta técnica se utilizó para la identificación de especies de estafilococos, tipado molecular, detección de mecanismos de resistencia y virulencia, clúster de evasión del sistema inmune humano y la determinación del contenido de bacteriófagos en las cepas estudiadas.

Para llevar a cabo la técnica de PCR se emplearon los siguientes termocicladores: Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) y T3 y T3000 Thermocycler (Biometra). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 µL de forma rutinaria y de 50 µL en aquellos casos que se requiriese secuenciar posteriormente el producto de PCR obtenido.

Cuando los fragmentos que se querían amplificar tenían un tamaño superior a 3000 pb y resultaban negativos al intentar amplificarse con BiotaqDNA Polimerasa (Bioline), se utilizó la enzima Taq-Takara DNA Polimerasa (TakaRaLA TaqTM, TakaraBio Inc.).

Las cantidades de reactivos utilizadas para las diferentes técnicas de PCR llevadas a cabo en esta tesis se detallan en las **tablas 13 y 14**.

Tabla 13. Reactivos utilizados en la técnica de PCR para un volumen final de 50 µL con la enzima BioTaq DNA polimerasa (Bioline).

Componentes	Concentración del stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador forward[1]	25 µM	1µL	0,5 µM
Cebador reverse[1]	25 µM	1µL	0,5 µM
Tampón de reacción NH_4 (Bioline)	10X	5µL	1X
$MgCl_2$ (Bioline)[2]	50 mM	1,5µL	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	2,5 mM	1µL	2 mM
BioTaq DNA polimerasa (Bioline)[3]	5 U/µL	0,3µL	0,03 U/µL
ADN	---	10µL	---
Agua miliQ estéril	---	Hasta 50 µL	---

[1]Los cebadores utilizados en este estudio fueron sintetizados por Sigma Aldrich.
[2]Se empleó 2 µL de $MgCl_2$ en las PCR múltiples (con más de un par de cebadores).
[3]Se empleó 0,5 µL de BioTaq en aquellas PCR con fragmentos superiores 2000 pb

Tabla 14. Reactivos utilizados en la técnica de PCR para un volumen final de 50 µL con Taq-Takara DNA Polimerasa (Takara).

Componentes	Concentración del stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebadorforward	25 µM	1 µL	0,5 µM
Cebadorreverse	25 µM	1 µL	0,5 µM
Taq-Takara DNA Polimerasa (Takara)	5 U/µL	0,5 µL	2,5 U
Tampón II(Takara)	10X	5 µL	1X
$MgCl_2$ (Takara)	25 mM	5 µL	2,5 mM
dNTPs mix (Takara)	2,5 mM	8 µL	2,5 mM
ADN	---	20µL	---
Agua miliQ estéril	---	Hasta 50 µL	---

Las condiciones de amplificación, cuando se empleó la enzima BioTaq DNA polimerasa, dependieron del gen o genes que se pretendía amplificar. Sin embargo, las condiciones de amplificación, siempre que se utilizó la enzima Taq-Takara, fueron: desnaturalización inicial (94ºC, 1 min); 30 ciclos (98ºC, 5 seg y 68ºC, 15 min) y elongación final (72ºC, 10 min).

En todas las reacciones, tanto con BioTaq DNA polimerasa como con Taq-Takara, se incluyeron un control positivo y dos controles negativos. Los controles negativos consistieron en un tubo sin ADN y otro con ADN de un organismo del que se sabía que no contenía dicho gen. En el caso del control negativo sin ADN el volumen se ajustó a 50 µL con agua miliQ estéril.

7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA CON CORRIENTE CONTINUA

Para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica de la PCR, se llevó a cabo una electroforesis horizontal en una matriz de gel de agarosa (Agarosa DD1, CONDA). Se trata de una técnica ampliamente utilizada en laboratorios de genética y biología molecular, donde se variará la concentración de la matriz del gel y el tiempo y voltaje de la cubeta electroforética (Wide mini Sub GT^{R}, BIORAD) para determinar la presencia del amplicón en el producto de PCR, así como su tamaño en pares de bases. Se utilizarán marcadores de peso molecular para la determinación de los tamaños de los fragmentos amplificados (HyperLadder^{TM} 100bp, BIOLINE).

8. IDENTIFICACIÓN DE *S. aureus* y SARM

Para la correcta identificación de SASM o SARM, además de las anteriores técnicas bioquímicas y microbiológicas (DNasa, catalasa y tinción Gram), se llevó a cabo la confirmación mediante una PCR múltiple, en la que se buscaba la detección de dos genes: gen *nuc* (termonucleasa constitutiva exclusiva de *S. aureus*) y el gen *mecA* (gen codificante de la PBP2a responsable en la mayor parte de los casos de la resistencia a meticilina). Además, en algunos casos, se utilizó una región del ARNr 16S como control interno (Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance, 2009) y posterior secuenciación para la confirmación de la especie (**Tabla 15**).

Tabla 15. Secuencia de cebadores empleados para la identificación de *S. aureus* y SARM.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Tamaño del amplicón	Referencia
nuc		
F: TCAGCAAATGCATCACAAACAG	255 pb	
R: CGTAAATGCACTTGCTTCAGG		
mecA		
F: GGGATCATAGCGTCATTATTC	527 pb	CLR-AR, 2009
R: AACGATTGTGACACGATAGCC		
ARNr16S		
F: GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	886 pb	
R: AGACCCGGGAACGTATTCAC		

Las condiciones de amplificación en la PCR fueron: desnaturalización inicial (94ºC durante 5 min); 30 ciclos (94ºC durante 30 seg, 55ºC durante 30 seg y 72ºC durante 1 min) y elongación final (72ºC durante 10 min).

9. TIPADO MOLECULAR DE LAS CEPAS OBTENIDAS

9.1. Tipado de la región polimófica del gen *spa*

Se caracterizaron genéticamente todas las cepas de *S. aureus* o SARM incluidas en este estudio según su tipo de *spa*. Para su realización se amplificó y secuenció el fragmento variable de la región polimórfica del gen *spa* (**Tabla 16**). Para el análisis de la región amplificada se utilizó el programa "RidomStaph-Type" versión 1.5.21 (RidomGmbH), el cual de manera automática detecta las diferentes repeticiones y asigna un tipo de *spa*.

Tabla 16. Secuencia de cebadores empleados para el tipado del gen *spa* y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**			**Referencia (tamaño del amplicón)**
spa	80ºC	5min	1 ciclo	
F: AGACGATCCTTCGGTGAGC R: GCTTTTGCAATGTCATTTACTG	94ºC 60ºC 72ºC	45seg 45seg 1,5 min	35 ciclos	Harmsen *et al*., 2003 (variable)
	72ºC	10min	1 ciclo	

9.2. Tipado del locus *agr*

Todas las cepas de *S. aureus* y SARM fueron tipadas según el tipo de locus *agr*. Para determinar los cuatro grupos de *agr* que existen se utilizó la técnica de PCR amplificando diferentes fragmentos (**Figura 27**). Para ello se realizaron dos PCRs dobles, amplificándose en la primera los tipos I y II y en la segunda los tipos III y IV. Los cebadores y condiciones de amplificación empleados en cada caso se detallan en la **Tabla 17**.

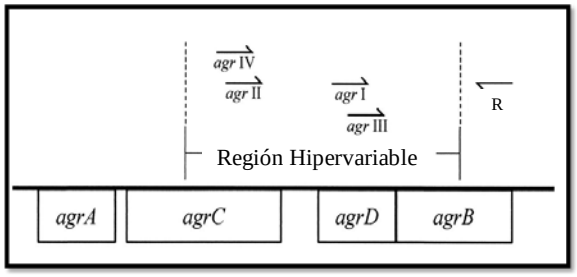


Figura 27. Representación del locus *agr* con la localización de los cebadores utilizados para la amplificación de la región hipervariable que delimita los diferentes grupos. El cebador pan *agr* fue el cebador reverse utilizado para la detección de los cuatro tipos de locus *agr* (modificada de Shopsin *et al*., 2003).

Tabla 17. Secuencia de cebadores empleados para el tipado de *agr* y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencias 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia (amplicón)**
***agr*I** F: GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT R: ATGCACATGGTGCACATGC	94ºC 5min 1 ciclo 94ºC 15seg 55ºC 30seg 30 ciclos 72ºC 2min 72ºC 7min 1 ciclo	Shopsin *et al*., 2003 (440 pb)
***agr*II** F: GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC R: ATGCACATGGTGCACATGC		Shopsin *et al*., 2003 (572 pb)
***agr*III** F: CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC R: ATGCACATGGTGCACATGC	94ºC 5min 1 ciclo 94ºC 15seg 55ºC 30seg 30 ciclos 72ºC 2min 72ºC 7min 1 ciclo	Shopsin *et al*., 2003 (406 pb)
***agr*IV** F: CGATAATGCCGTAATACCCG R: ATGCACATGGTGCACATGC		Shopsin *et al*., 2003 (656 pb)

9.3. Tipado por Multi-locus sequence typing (MLST)

Para llevar a cabo esta técnica se amplificó mediante PCR los siete genes constitutivos o también conocidos como housekeeping presentes de forma conservada en el genoma de *S. aureus*. Estos genes presentan una mayor similitud cuanto mayor sea la cercanía evolutiva de los aislados. El producto de PCR se secuenció con el fin de determinar el alelo presente en cada uno de los siete genes. Según la combinación de los alelos se pudo determinar la secuencia tipo (ST) de cada uno de los aislados. Todo ello fue comparado con la base de datos de www.mlst.net. Además, gracias al programa informatico eBurst v3, se estableció a que Complejo Clonal (CC) pertenecían los STs obtenidos.

MLST de *S. aureus*

El tipado por MLST de las cepas de *S. aureus* se realizó analizando la secuencia de siete genes constitutivos: *arcC* (carbamato quinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *glpF* (glicerol quinasa), *gmk* (guanilato quinasa), *pta* (fosfato acetyltransferasa), *tpi*(triosafosfatoisomerasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (Enright *et al*., 2000).

Tabla 18. Secuenciade cebadores empleados para el MLST de *S. aureus*.

Gen	Cebadores (secuencia 5´→3´)	Tamaño del amplicón
arcC	F: TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC R: AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456 pb
aroE	F: ATCGGAAATCCTATTTCACATTC R: GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456 pb
glpF	F: CTAGGAACTGCAATCTTAATCC R: TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465 pb
gmk	F: ATCGTTTTATCGGGACCATC R: TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429 pb
pta	F: GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R: GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474 pb
tpi	F: TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA R: TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402 pb
yqiL	F: CAGCATACAGGACACCTATTGGC R: CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516 pb

Las condiciones de amplificación fueron las mismas para cada uno de los siete genes: desnaturalización inicial (95ºC, 5 min); 30 ciclos (95ºC, 1 min; 55ºC, 1 min y 72ºC, 1 min) y elongación final (72ºC, 5 min).

9.4. Electroforesis en Campos pulsados (PFGE)

Para determinar la relación clonal existente entre las distintas cepas *S. aureus*, se llevó a cabo una electroforesis de campos pulsados (PFGE). Para la realización de la técnica se siguió el protocolo descrito por HARMONY PFGE protocolo (Murchan *et al*., 2003), con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

Cepas. Partiendo de un cultivo puro en placas de BHI agar (Difco), se inoculó 1 mL de caldo BHI (Difco) con una única colonia y se incubó a 37ºC durante 18-24 horas. Posteriormente, se centrifugó 200 µL de la suspensión bacteriana a 13000 r.p.m. durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. Así, conseguimos quedarnos sólo con el sedimento en donde se encontraban las células bacterianas.

Preparación de los insertos. Se resuspendieron completamente las células bacterianas en 200 µL de una solución de 0,5X TBE (Tris-HCl pH 8,3, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8) y se mezclaron con otros 200 µL de agarosa de alta pureza (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) preparada también con 0,5X TBE y estabilizada a 50ºC. La mezcla se dispensó en los moldes

adecuados y se dejó a temperatura ambiente durante 10-15 min hasta su completa solidificación.

Solución de lisis. Se colocó cada inserto en tubos que contenían 1 mL de una solución de lisis (Tris-HCl 6mM, NaCl 1M, EDTA 100 mM pH 8, Brij58 0,5%, ácido desoxicólico 0,2%, sarcosyl 0,5 %, lisostafina 100 µg/mL) y se mantuvo en agitación a 37ºC durante un mínimo de 2 horas.

Solución con proteólisis. Se eliminó la solución de lisis decantando y se añadió a cada inserto 1 mL de solución de proteolisis (EDTA 0,5 M pH 9,5, sarcosyl 1% y proteinasa K 50 µg/mL). Se dejó en agitación a 56ºC un mínimo de 4 horas.

Lavados. Se eliminó la solución de proteolisis y se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 8) en agitación a 37 ºC. Los insertos se guardaron a 4ºC, para próximas aplicaciones.

Digestión enzimática. Se utilizaron tres enzimas para la digestión de los insertos. En el caso de cepas de *S. aureus* no pertenecientes al complejo clonal CC398 se empleó la enzima *Sma*I. Para las cepas de *S. aureus* CC398 se utilizó la enzima *Xma*I y *cfr9I* (estereoisómero de *XmaI*) debido a que estas cepas presentan una metilación en residuos de adenina y citosina que impide el corte por parte de *Sma*I (Kadlec *et al*., 2009). Para llevar a cabo la digestión, se cortó un tercio de cada inserto y se introdujo en un tubo eppendorf con 100 µL de solución de digestión: 10 U de la enzima *Sma*I o de la enzima *Apa*I (New England BioLabs), 1 µL de BSA 0,1% (en el caso de *Xma*I), 10 µL del tampón "NEBuffer4" 1X de la enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Se incubó en el baño a 25ºC (*Sma*I) o 37ºC (*Apa*I) durante un mínimo de 4 horas.

Electroforesis. Se preparó un gel de agarosa D-5 (Pronadisa, Conda) al 1,2 % en TBE 0,5X. En cada gel se colocaron al menos dos carriles con el marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker o MiddleRange PFG Marker (New EnglandBiolabs). Se colocaron los insertos correspondientes en el resto de carriles y se sellaron con agarosa a 50ºC. La electroforesis se desarrolló en el aparato CHEF DR-II Drive Module (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X con una punta de espátula de tiourea. Las condiciones fueron diferentes en función de la enzima utilizada. Para *Sma*I fueron: 6 V/cm^2 con pulsos de 5 a 50, a una temperatura de 14 ºC durante 22 horas. En el caso de la enzima *Apa*I los pulsos fueron de 2 a 5 durante 20 horas.

Tinción del gel y visualización. El gel se tiñó con una solución acuosa de bromuro de etidio (10 µL de bromuro de etidio en 200 mL de agua destilada) por inmersión durante 20 min en agitación. Transcurrido el tiempo de tinción se visualizó el gel con luz ultravioleta. Según el resultado obtenido se destiñó con agua destilada y se fotografió con un captador de imágenes

(Image Store 5000, UVP) gracias al programa informático ChemiGenius (GenSnap from SynGene).

Análisis de los patrones de PFGE. Los patrones de PFGE fueron comparados e interpretados siguiendo las directrices propuestas por Tenover *et al*., 1995. Así, fueron clasificados como indistinguibles, estrechamente relacionados, posiblemente relacionados o diferentes. De este modo, se le asignó una letra a cada patrón de PFGE diferente, y números a los diferentes subtipos dentro de un mismo patrón. Por subtipo se consideró aquellos patrones que se diferenciasen por tres o menos bandas. Para el análisis de los patrones de bandas PFGE se utilizó el programa BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

9.5. Tipado del casete cromosómico SCC*mec*

Esta técnica se empleó tan sólo en aquellas cepas que presentaban resistencia a meticilina. Para el tipado del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) se realizaron una serie de PCRs múltiples con el fin de determinar el tipo de "*ccr*" y de "*complejo mec*". Se estudiaron, además, algunas zonas intermedias que pudiesen ayudar a determinar dicha estructura. Los cebadores y condiciones de PCR empleados se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Secuencia de cebadores empleados para la determinación del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
ccrA1-ccrB		Kondo *et al*., 2007
F: AACCTATATCATCAATCAGTACGT	94ºC 2min 1 ciclo	(695 pb)
R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	94ºC 2min 57ºC 1min 30 ciclos 72ºC 3min	
ccrA2-ccrB		Kondo *et al*., 2007
F: TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	72ºC 7min 1 ciclo	(937 pb)
R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		
ccrA3-ccrB	94ºC 2min 1 ciclo	Kondo *et al*., 2007
F: AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	94ºC 2min 57ºC 1min 30 ciclos 72ºC 3min	(1791 pb)
R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	72ºC 7min 1 ciclo	
ccrA4-ccrB4	94ºC 2min 1 ciclo	Kondo *et al*., 2007
F: TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT	94ºC 2min 57ºC 1min 30 ciclos 72ºC 3min	(1287pb)
R: AGAAAAGATAGAAGTTCGAAAGA	72ºC 7min 1 ciclo	

Continuación Tabla 19. Secuencia de cebadores empleados para la determinación del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
ccrC	94ºC 5min 1 ciclo	Witte *et al*., 2007
F: CACTTAATCCATGTACACAG	94ºC 1min	(336 pb)
R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA	50ºC 1min 30 ciclos	
	72ºC 2min	
	72ºC 10min 1 ciclo	
mecA-mecI		Kondo *et al*., 2007
F: CATAACTTCCCATTCTGCAGATG		(1963 pb)
R: ATATACCAAACCCGACAACTACA		
	94ºC 2,5 min 1 ciclo	
mecA-IS1272	94ºC 2min	Kondo *et al*., 2007
F: ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	60ºC 1min 30 ciclos	(2827 pb)
R: ATATACCAAACCCGACAACTACA	72ºC 3min	
	72ºC 7min 1 ciclo	
mecA-IS431		Kondo *et al*., 2007
F: TGAGGTTATTCAGATATTTCGATGT		(804 pb)
R: ATATACCAAACCCGACAACTACA		
SCC*mec* I		Zhang *et al*., 2005
F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG		(613 pb)
R: GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
SCC*mec* II		Zhang *et al*., 2005
F: CGTTGAAGATGATGAAGCG	94ºC 5min 1 ciclo	(398 pb)
R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC	94ºC 45seg	
SCC*mec* III	65ºC 45seg 10 ciclos	Zhang *et al*., 2005
F: CCATATTGTGTACGATGCG	72ºC 1,5min	(280 pb)
R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	72ºC 7min 1 ciclo	
SCC*mec* IVa	94ºC 45seg	Zhang *et al*., 2005
F: GCCTTATTCGAAGAAACCG	55ºC 45seg 25 ciclos	(776 pb)
R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	72ºC 1,5min	
	72ºC 10min 1 ciclo	

Continuación Tabla 19. Secuencia de cebadores empleados para la determinación del casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
SCC*mec* IVb F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	94ºC 5min 1 ciclo 94ºC 45seg 65ºC 45seg 10 ciclos 72ºC 1,5min 72ºC 7min 1 ciclo	Zhang *et al*., 2005 (493 pb)
SCC*mec* IVc F: ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG	94ºC 45seg 55ºC 45seg 25 ciclos 72ºC 1,5min 72ºC 10min 1 ciclo	Zhang *et al*., 2005 (200 pb)
SCC*mec* IVd F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		Zhang *et al*., 2005 (881 pb)
SCC*mec* V F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		Zhang *et al*., 2005 (325 pb)
SCC*mec* XI F: TTTGGATTGTATGGTTRGA R: CTCAAACGGACATCATCA	94ºC 2 min 1 ciclo 94ºC 1 min 51ºC 2 min 40 ciclos 72ºC 3min 72ºC 10 min 1 ciclo	Cuny *et al*., 2011 (261 pb)

10. DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Mediante PCR y secuenciación se procedió al estudio de los determinantes de resistencia a antibióticos en las cepas de *S. aureus* que presentaban un perfil fenotípico de resistencia para los siguientes antibióticos:

Resistencia a meticilina y no portadores de *mecA*:

Tabla 20. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a meticilina.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
mec*$_{LGA251}$*(mecC) F: GCTCCTAATGCTAATGCA R: TAAGCAATAATGACTACC	95ºC 2 min 1 ciclo 94ºC 30 seg 50ºC 30 seg 30 ciclos 72ºC 30 seg 72ºC 4 min 1 ciclo	Cuny *et al*., 2011 (304pb)

Resistencia a tetraciclina:

Tabla 21. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
***tet*(K)** F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACTCATTCCAGAAGCA	94ºC 1 min 1 ciclo 94ºC 1 min 55ºC 2 min 30 ciclos 72ºC 2 min 72ºC 10 min 1 ciclo	Aarestrup *et al*., 2000 (697 pb)
***tet*(M)** F: GTTAAATAGTGTTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA		Aarestrup *et al*., 2000 (576 pb)
***tet*(L)** F: CATTTGGTCTTATTGGATCG R: ATTACACTTCCGATTTCGG	94ºC 1 min 1 ciclo 94ºC 1 min 50ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 10 min 1 ciclo	Aarestrup *et al*., 2000 (456 pb)
***tet*(O)** F: GATGGCATACAGGCACAGAC R: CAATATCACCAGAGCAGGCT		Aarestrup *et al*., 2000 (615 pb)

Resistencia a penicilina:

Tabla 22.- Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a penicilina.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
blaZ F: CAGTTCACATGCCAAAGAG R: TACACTCTTGGCGGTTTC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 50ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 2 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (772 pb)
blaZ-SCCmec XI F: AGTCGTGTTAGCGTTGATATTAA R: CAATTTCAGCAACCTCACTTACTA	94ºC 5 min 1 ciclo 94ºC 1 min 58ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 2 min 72ºC 5 min 1 ciclo	García-Alvarez *et al*., 2011 (809pb)

Resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas:

Tabla 23. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia** (amplicón)
***erm*(A)** F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG	93ºC 3 min 1 ciclo 93ºC 1 min 52ºC 1 min 35 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Sutcliffe *et al*., 1996 (645 pb)
***erm*(B)** F: GAAAAGTACTCAACCAAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA		Sutcliffe *et al*., 1996 (639 pb)
***erm*(C)** F: TCAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	93ºC 3 min 1 ciclo 93ºC 1 min 52ºC 1 min 35 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Sutcliffe *et al*., 1996 (642 pb)
***erm*(F)** F: CGGGTCAGCACTTTACTATTG R: GGACCTACCTCATAGACAAG	94ºC 3min 1 ciclo 94ºC 30 seg 50ºC 30 seg 35 ciclos 72ºC 2min 72ºC 7min 1 ciclo	Chung *et al*., 1999 (466 pb)
***erm*(T)** F: CCGCCATTGAAATAGATCCT R: TTCTGTAGCTGTGCTTTCAAAAA	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 55ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz *et al*., 2010 (200 pb)
***msr*(A)/*msr*(*B*)** F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAACT R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT	95ºC 3 min 1 ciclo 93ºC 30 seg 55ºC 2 min 35 ciclos 72ºC 1,5 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Wondrack *et al*., 1996 (399 pb)
***mph*(C)** F: ATGACTCGACATAATGAAAT R: CTACTCTTTCATACCTAACTC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 45ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Schnellmann *et al*., 2006 (900 pb)

Tabla 23. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia** (amplicón)
***lnu*(A/A')** F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAACTGG R:GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGATC	94ºC 2min 1 ciclo 94ºC 30seg 57ºC 30seg 30ciclos 72ºC 1min 72ºC 10min 1 ciclo	Lina *et al*., 1999 (322 pb)
***lnu*(B)** F: CCTACCTATTGTTTGTGGAA R: ATAACGTTACTCTCCTATTC	94ºC 5min. 1 ciclo 94ºC 45seg 54ºC 45seg 35 ciclos 72ºC 1min 72ºC 5min 1 ciclo	Bozdogan *et al*., 1999 (944 pb)
***lnu*(C)** F: ACTGTCGCAGAGCAGGAAAGCC R: AGCATCTACACCCCAGCCACCA	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 58ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Lozano *et al*., 2012 (1111 pb)
***lnu*(D)** F: ACGGAGGGATCACATGGTAAATAAAGC R: CCTGTCTTTATCGTCCTTCCAAACCGT	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 58ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Lozano *et al*., 2012 (461 pb)
vga*(A)- variante de *vga(A) F: AGTGGTGGTGAAGTAACACG R: GGTTCAATACTCAATCGACTGAG	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 56ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Lozano *et al*., 2012 (1264 pb)
***vga*(B)** F: TGACAATATGAGTGGTGGTG R: GCGACCATGAAATTGCTCTC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 54ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Hammerum *et al*., 1998 (576 pb)
***vga*(C)** F: ACGAGGGGACAATCACGCCG R: TTGGTCGTCGGTTCGTCTGC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 58ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz *et al*., 2010 (156 pb)

Tabla 23. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia** (amplicón)
***vga*(E)** F: GAAATATGGGAAATAGAAGATGG R: TGATTCTCTAACCACTCTTC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 52ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Schwendener *et al*., 2011 (994 pb)
***lsa*(B)** F: TGCCGAAGCCATGTACCGTCC R: CGGTTAGACCAACCAGCCGAACG	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 56ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz *et al*., 2010 (396 pb)
***cfr*[1]** F: TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 56ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Kehrenberg *et al*., 2006 (746 pb)

[1]El gen *cfr* proporcionaresistencia a oxazolidinonas, fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptograminas.

Resistencia a quinolonas:

Para el estudio de la resistencia a quinolonas se analizó la presencia de mutaciones en los genes *grlA* y *gyrA*. Para ello, se realizaron PCRs con los cebadores específicos para ambos genes y posteriormente se secuenciaron los amplicones obtenidos. Las secuencias se compararon con las secuencias de referencia: para *S. aureus* (*grlA*-GenBank D10489.1 y *gyrA*-GenBank D67075.1).

Tabla 24. Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *grlA* y *gyrA*.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia (amplicón)**
grlA F: ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA	94ºC 10 min 1 ciclo 94ºC 20 seg 55ºC 20 seg 25 ciclos 72ºC 50 seg 72ºC 5 min 1 ciclo	Schmitz *et al*., 1998 (559 pb)
gyrA F: AATGAACAAGGTATGACACC R: TACGCGCTTCAGTATAACGC	94ºC 10 min 1 ciclo 94ºC 20 seg 55ºC 20 seg 25 ciclos 72ºC 50 seg 72ºC 5 min 1 ciclo	Schmitz *et al*., 1998 (222 pb)

Resistencia a aminoglucósidos:

Tabla 25. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
***aac*(6´)-Ie-*aph*(2´´)-Ia** F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATAACCACTACCG	94ºC 5 min 1 ciclo 94ºC 30 seg 60ºC 45 seg 30 ciclos 72ºC 2 min 72ºC 7 min 1 ciclo	Van de Klundert *et al*., 1993 (220 pb)
***aph*(3´)-IIIa** F: GCCGATGTGGATTGCGAAAA R: GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 30 seg 60ºC 45 seg 32 ciclos 72ºC 2 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Van de Klundert *et al*., 1993 (292 pb)
***ant*(4´)-Ia** F: GCAAGGACCGACAACATTTC R: TGGCACAGATGGTCATAACC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 30 seg 60ºC 45 seg 32 ciclos 72ºC 2 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Van de Klundert *et al*., 1993 (165 pb)
str F: TATTGCTCTCGAGGGTTC R: CTTTCTATATCCATTCATCTC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 50ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Schnellmann *et al*.,2006 (646pb)

Resistencia a trimetroprim:

Tabla 26. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a trimetoprim.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
dfrS1 (dfrA) F: CCTTGGCACTTACCAAATG R: CTGAAGATTCGACTTCCC	94ºC 3 min 1 ciclo 94ºC 1 min 50ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min 72ºC 5 min 1 ciclo	Schnellmann *et al*.,2006 (374 pb)

Continuación Tabla 26. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a trimetoprim.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
dfrD	94ºC 3 min 1 ciclo	Schnellmann *et al.*,2006 (582 pb)
F: TTCTTTAATTGTTGCGATGG	94ºC 1 min	
R: TTAACGAATTCTCTCATATATATG	50ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 5 min 1 ciclo	
dfrG	94ºC 3 min 1 ciclo	Gómez-Sanz *et al*., 2010
F: TCGGAAGAGCCTTACCTGACAGAA	94ºC 1 min	(323 pb)
R:CCCTTTTTGGGCAAATACCTCATTCCA	58ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 5 min 1 ciclo	
dfrK	94ºC 3 min 1 ciclo	Gómez-Sanz *et al*., 2010
F: GAGAATCCCAGAGGATTGGG	94ºC 1 min	(423 pb)
R: CAAGAAGCTTTTCGCTCATAAA	56ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 5 min 1 ciclo	

Resistencia a fenicoles:

Tabla 27. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a fenicoles.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
fexA	94ºC 1min 1 ciclo	Kehrenberg *et al*., 2005
F: GTACTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA	94ºC 1min	(1272 pb)
R: CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC	48ºC 2min 34 ciclos	
	72ºC 3min	
	72ºC 7min 1 ciclo	
***cat*$_{pC221}$**	94ºC 3 min 1 ciclo	Schnellmann *et al*., 2006
F: ATTTATGCAATTATGGAAGTTG	94ºC 1 min	(434 pb)
R: TGAAGCATGGTAACCATCAC	50ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 5 min 1 ciclo	
***cat*$_{pC194}$**	94ºC 3 min 1 ciclo	Schnellmann *et al*., 2006
F:CGACTTTTAGTATAACCACAGA	94ºC 1 min	(570 pb)
R:GCCAGTCATTAGGCCTAT	50ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 5 min 1 ciclo	

Continuación Tabla 27. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a fenicoles.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
***cat*$_{pC223}$**	94ºC 3 min 1 ciclo	Schnellmann *et al*., 2006
F:GAATCAAATGCTAGTTTTAACTC	94ºC 1 min	(283 pb)
R:ACATGGTAACCATCACATAC	50ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 5 min 1 ciclo	

Resistencia a linezolid:

Para estudiar la resistencia a linezolid se analizó si las cepas presentaban el gen *cfr* (cuyos cebadores se muestran en la **Tabla 28**), se estudió la presencia de mutaciones en el ARNr 23S, y se estudiaron los posibles cambios aminoacídicos en las proteínas L3, L4 y L22. Las secuencias se compararon con: ARNr 23S (GenBankX68425.1) y las correspondientes a las proteínas L3, L4 y L22 (GenBankGQ995195.1).

Tabla 28. Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación del ARNr 23S y de los genes codificantes de las proteínas L3, L4 y L22.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
ARNr 23S	94ºC 5 min 1 ciclo	Dibo *et al*., 2004
F: GCGGTCGCCTCCTAAAAG	94ºC 1 min	(420 pb)
R: ATCCCGGTCCTCTCGTACT	54ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 7 min 1 ciclo	
***rplC* (L3)**	94ºC 5 min 1 ciclo	Miller *et al*., 2008
F: ACCCTGATTTAGTTCCGTCTA	94ºC 1 min	(799 pb)
R: GTTGACGCTTTAATGGGCTTA	52ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 7 min 1 ciclo	
***rplD* (L4)**	94ºC 5 min 1 ciclo	Miller *et al*., 2008
F: TCGCTTACCTCCTTAATG	92ºC 1 min	(1080 pb)
R: GGTGGAAACACTGTAACTG	54ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 7 min 1 ciclo	
***rplV* (L22)**	94ºC 5 min 1 ciclo	Mendes *et al*., 2010
F: CAACACGAAGTCCGATTGGA	94ºC 1 min	(468 pb)
R: GCAGACGACAAGAAAACAAG	52ºC 1 min 30 ciclos	
	72ºC 1 min	
	72ºC 7 min 1 ciclo	

Resistencia a mupirocina:

En las cepas de *S. aureus* se estudió por PCR la presencia del gen *mupA* y *mupB* (responsable del fenotipo de resistencia de alto nivel) y por PCR y secuenciación se analizó si existían mutaciones en *ileS* (lo que da lugar a un fenotipo de resistencia de bajo nivel) (**Tabla 29**). Las secuencias de *ileS* se compararon con la secuencia base del GenBank FR821779.1.

Tabla 29. Secuencia de los cebadores y condiciones empleadas para la amplificación de los genes *mupA* e *ileS*.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
mupA	94ºC 5min 1 ciclo	Udo *et al*., 2003
F: CCCATGGCTTACCAGTTGA	94ºC 3min	(419 pb)
R: CCATGGAGCACTATCCGAA	60ºC 45seg 32ciclos 72ºC 1min	
	72ºC 2min. 1 ciclo	
mupB	94ºC 1 min 1 ciclo	Seah *et al.,* 2012
F: CTAGAAGTCGATTTTGGAGTAG	94ºC 30 seg	(674 pb)
R: AGTGTCTAAAATGATAAGACGAT	53ºC 30seg 35ciclos 68ºC 4 min	
	72ºC 7 min. 1 ciclo	
ileS[1]	94ºC 5 min 1 ciclo	Hurdle *et al*., 2004
F:AGCCTAGTAAAAGCATGTATGTTATATCAC	94ºC 1 min	(3217 pb)
R:GCGTTACTGTTATGATACATTCAATTAACT	50ºC 2 min 30 ciclos 72ºC 3 min	
	72ºC 7 min 1 ciclo	

[1]Para secuenciar el gen *ileS* se utilizaron los cebadores empleados en la PCR y el cebador ileS-sec (GGACAATTCCATCAAATGTTGCG) y ileS-sec2 (CTTCAGTTGCTACAAGAGGAG).

Resistencia a ácido fusídico:

Para estudiar los mecanismos de resistencia a ácido fusídico, se analizó las posibles mutaciones en el gen *fusA* (comparándolo con la secuencia base del GenBank CP000253.1) y la presencia de los genes *fusB* y *fusC*.

Tabla 30.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *fusA, fusB* y *fusC*.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	Condiciones	Referencia (amplicón)
fusA[1]	94ºC 5 min 1 ciclo	O'Neill *et al*., 2002
F: CGCGGATCCTATCGTATTTATTCAGTAAT	94ºC 1 min	(2100 pb)
R: AAGGATCCCTTGTATTTTAACCTAGGCTA	56ºC 1 min 30 ciclos 72ºC 1 min	
	72ºC 7 min 1 ciclo	

Continuación Tabla 30.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *fusA, fusB* y *fusC*.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia (amplicón)**
fusB	94ºC 3 min 1 ciclo	McLaws *et al*., 2011
F: CTATAATGATATTAATGAGATTTTTGG	94ºC 30 seg	(431 pb)
R: TTTTTACATATTGACCATCCGAATTGG	57ºC 30 seg 25 ciclos	
	72ºC 45 seg	
	72ºC 7 min 1 ciclo	
fusC	94ºC 3 min 1 ciclo	McLaws *et al*., 2011
F: TTAAAGAAAAAGATATTGATATCTCGG	94ºC 30 seg	(332 pb)
R: TTTACAGAATCCTTTTACTTTATTTGG	57ºC 30 seg 25 ciclos	
	72ºC 45 seg	
	72ºC 7 min 1 ciclo	

[1]Para secuenciar el gen *fusA* se utilizaron los siguientes cebadores fusA1 (GCGTCAGGCTACAACTTATGG), fusA2 (CAATAGTTACTTTCATCATTGG) y fusA3 (TTATTGGTCACCGTGCTAGCAACC).

11. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA

Se llevó a cabo la determinación mediante PCR simple y secuenciación en algunos casos, de una batería de genes de virulencia: genes *lukF*-PV y *lukS*-PV que codifican la leucocidina de Panton-Valentine (LPV), genes *luk*-DE y *luk*-M, codificantes de otras leucocidinas de importancia clínica y animal, genes codificantes de las hemolisinas alfa-, beta-, delta-, gamma- y gamma-variante (*hla, hlb, hld, hlg y hlgv*), genes codificantes de las toxinas exfoliativas A, B y D (*eta, etb, etd, etd2*), y el gen codificante de la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST) (*tst*).

Las condiciones de amplificación fueron las mismas para cada uno de los genes: desnaturalización inicial (94ºC, 5 min); 30 ciclos (94ºC, 30 seg; 55ºC, 30 seg y 72ºC, 1 min) y elongación final (72ºC, 10 min), excepto para el gen etD2 cuya Tm fue de 52ºC.

Tabla 31. Secuencia de los cebadores empleados en las PCRs simples para la amplificación de genes codificantes de factores de virulencia.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Referencia (amplicón)**
***lukF*-PV/*lukS*-PV**	Lina *et al*., 1999
F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	(443 pb)
R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC	
Luk-DE	Jarraud *et al*., 2002
F: TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG	(269 pb)
R: TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	

Continuación Tabla 31. Secuencia de los cebadores empleados en las PCRs simples para la amplificación de genes codificantes de factores de virulencia.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Referencia (amplicón)**
Luk-M	Jarraud *et al*., 2002
F: TGGATGTTACCTATGCAACCTAC	(780 pb)
R: GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC	
hla	Jarraud *et al*, 2002
F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	(209 pb)
R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	
hlb	Jarraud *et al*., 2002
F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC	(309 pb)
R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	
hld	Jarraud *et al*., 2002
F: AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	(111pb)
R: TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA	
hlg	Jarraud *et al*., 2002
F: GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	(535 pb)
R: CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG	
hlg$_v$	Jarraud *et al*., 2002
F: GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	(390 pb)
R: ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG	
eta	Jarraud *et al*., 2002
F: ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	(190 pb)
R: TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	
etb	Jarraud *et al*., 2002
F: CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	(612 pb)
R: AGTGAACTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	
etd	Yamaguchi *et al*., 2002
F: AACTATCATGTATCAAGG	(376 pb)
R: CAGAATTTCCCGACTCAG	
etd2	Monecke *et al*., 2013
F: TCAAGACACCACTAGAAGTC	(843 pb)
R: CGTTTTCAGCTAATCGTGC	
tst	Jarraud *et al*., 2002
F: TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT	(180 pb)
R: TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	

Así mismo, se analizó la presencia de genes codificantes de 18 enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser* y *seu*) mediante la realización de tres PCRs múltiples (Hwang *et al*., 2007). En la primera se incluyeron los cebadores para los genes *seb, sed, sei, sej, sep, seq* y *ser*; en la segunda *sea, sec, sek, sem*y *sen*; y en la tercera *see, seg, seh, sel, seo* y *seu*. Además en todas ellas se empleó como control interno de la PCR el gen *femA*.

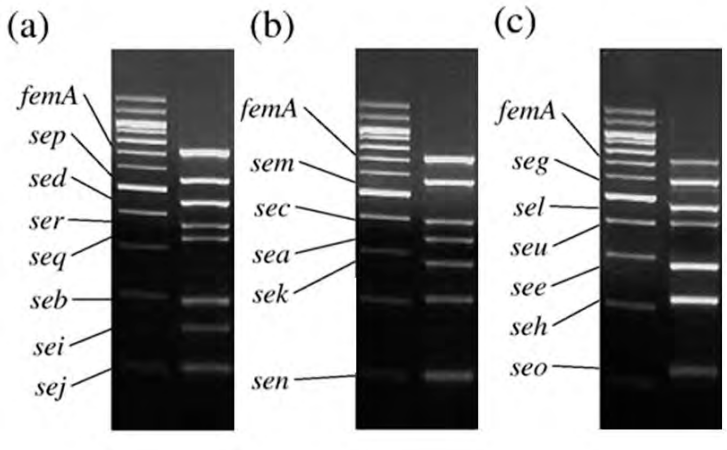


Figura 28. Gel con los tamaños de los amplicones de las 18 enterotoxinas: a) primera PCR múltiple; b) segunda PCR múltiple; c) tercera PCR múltiple (tomada de Hwang*et al*., 2007).

Tabla 32. Secuencia de los cebadores empleados en las tres PCRs múltiples para la amplificación de los genes codificantes de las 18 enterotoxinas (Hwang *et al*., 2007).

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Tamaño del amplicón**
sea	344 pb
F: ATGGTTATCAATGTGCGGGTGIIIIICCAAACAAAAC	
R: TGAATACTGTCCTTGAGCACCAIIIIIATCGTAATTAAC	
seb	196 pb
F: TGGTATGACATGATGCCTGCACIIIIIGATAAATTTGAC	
R: AGGTACTCTATAAGTGCCTGCCTIIIIIACTAACTCTT	
sec	399 pb
F: GATGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCIIIIIACTATGTAAAC	
R: AGATTGGTCAAACTTATCGCCTGGIIIIIGCATCATATC	
sed	451 pb
F: CTGAATTAAGTAGTACCGCGCTIIIIIATATGAAAC	
R: TCCTTTTGCAAATAGCGCCTTGIIIIIGCATCTAATTC	
see	286 pb
F: CGGGGGTGTAACATTACATGATIIIIICCGATTGACC	
R: CCCTTGAGCATCAAACAAATCATAAIIIIICGTGGACCCTTC	
seg	594 pb
F: ATAGACTGAATAAGTTAGAGGAGGTIIIIIGAAGAAATTATC	
R: TTAGTGAGCCAGTGTCTTGCIIIIIAATCTAGTTC	

Continuación Tabla 32. Secuencia de los cebadores empleados en las tres PCRs múltiples para la amplificación de los genes codificantes de las 18 enterotoxinas (Hwang *et al*., 2007).

seh	218 pb
F: CATTCACATCATATGCGAAAGCAGIIIIITTACACG	
R: CTTCTGAGCTAAATCAGCAGTTGCIIIIITTACTCTC	
sei	154 pb
F: AGGCGTCACAGATAAAAACCTACCIIIIICAAATCAACTC	
R: ACAAGGACCATTATAATCAATGCCIIIIITATCCAGTTTC	
sej	102 pb
F: TGTATGGTGGAGTAACACTGCATGIIIIIAATCAACTTTATG	
R: CTAGCGGAACAACAGTTCTGATGCIIIIIATCCATAAAT	
sek	282 pb
F: GTGTCTCTAATAATGCCAGCGCTIIIIICGATATAGG	
R: CGTTAGTAGCTGTGACTCCACCIIIIITGTATTTAG	
sel	469 pb
F: ATTCACCAGAATCACACCGCTIIIIITACTCGTA	
R: GTGTAAAATAAATCATACGAGIIIIIAGAACCATCATTC	
sem	572 pb
F: CGCAACCGCTGATGTCGGIIIIITGAATCTTAGG	
R: CAGCTTGTCCTGTTCCAGTATCIIIIIAGTCATAAG	
sen	103 pb
F: TCATGCTTATACGGAGGAGTTACGIIIIITGATGGAAATC	
R: AACCTTCTTGTTGGACACCATCIIIIIATACATTAACGC	
seo	116 pb
F: GTGGAATTTAGCTCATCAGCGATTTCIIIIIAATTTCTAGG	
R: GTACAGGCAGTATCCACTTGATGCIIIIIATGACAATGTGC	
sep	547 pb
F: ATCATAACCAACCGAATCACCAGIIIIIGGGTGAAACTC	
R: GTCTGAATTGCAGGGAACTGCIIIIIGCAATCTTAG	
seq	330 pb
F: GGTGGAATTACGTTGGCGAATCAIIIIITAGATAAACC	
R: CTCTGCTTGACCAGTTCCGGTGIIIIICAAATCGTATG	
ser	368 pb
F: TTCAGTAAGTGCTAAACCAGATCCIIIIICTGGAGAATTG	
R: CTGTGGAGTGCATTGTAACGCCIIIIIATATGCAAACTCC	

Continuación Tabla 32. Secuencia de los cebadores empleados en las tres PCRs múltiples para la amplificación de los genes codificantes de las 18 enterotoxinas (Hwang *et al*., 2007).

seu	410 pb
F: ATGGCTCTAAAATTGATGGTTCTAIIIIITTAAAAACAG	
R: GCCAGACTCATAAGGCGAACTAIIIIITTCATATAAA	
femA	723 pb
F: ACAGCTAAAGAGTTTGGTGCCTIIIIIGATAGCATGC	
R: TTCATCAAAGTTGATATACGCTAAAGGTIIIIICACACGGTC	

Las condiciones de amplificación para las tres PCRs múltiples fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94ºC, 10 min); 30 ciclos (94ºC, 30 seg; 50ºC, 30 seg y 72ºC, 2 min) y elongación final (72ºC, 10 min).

En algunos casos también se estudiaron las toxinas *aur, cna* y *bap*, responsables de la facilitación en las infecciones invasivas, la adhesión del microorganismo a tejidos blandos y la formación de biofilm, respectivamente.

Tabla 33.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección del gen *aur, cna* y *bap*.

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Condiciones**	**Referencia (tamaño del amplicón)**
aur	94ºC 3min 1 ciclo	Sabat et al., 2000
F: TGGATTGGTGATAAAATGAT	94ºC 1min	(550 pb)
R: ACTTCATTCCATGCTTCATA	53ºC 1min 30 ciclos	
	72ºC 2min	
	72ºC 6min 1 ciclo	
cna	94ºC 5min 1 ciclo	Witte *et al*., 2007
F: CGGTTCCCCCATAAAAGTGAAG	94ºC 1min	(400 pb)
R: CCCATAGCCTTGTGGATTTG	50ºC 1min 30 ciclos	
	72ºC 2min	
	72ºC 10min 1 ciclo	
bap	94ºC 2 min 1 ciclo	Cucarella et al., 2001
F: CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	94ºC 1min	(971 pb)
R: GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	60ºC 1min 30 ciclos	
	72ºC 1min	
	72ºC 10min 1 ciclo	

12. ESTUDIO DEL CLÚSTER DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE HUMANO (IMMUNE EVASION CLUSTER – IEC)

Se realizó el estudio del conjunto de genes que forman parte del sistema que permite a *S. aureus* evadir las primeras barreras del sistema inmune humano. Se estudió mediante PCR, y secuenciación en algunos casos, el gen *scn* (inhibidor estafilocócico del sistema del complemento humano), *chp* (inhibidor de la opsonización del microorganismo por parte de los macrófagos humanos), *sak* (degrada la fibrina y permite la invasión en tejidos vecinos), y las enterotoxinas *sea* y *sep*. La **figura 29** muestra la estructura genética del sistema IEC completo y la **tabla 34** los cebadores utilizados en cada una de las PCRs.

Figura 29. Estructura del sistema IEC (elaboración propia basada en van Wamel *et al*., 2006).

Tabla 34.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección de los genes del sistema IEC (*van Wamel et al., 2006*)

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Tamaño del amplicón**
scn	257 pb
F: AGCACAAGCTTGCCAACATCG	
R: TTAATATTTACTTTTTAGTGC	
chp	366 pb
F: TTTACTTTTGAACCGTTTCCTAC	
R: CGTCCTGAATTCTTAGTATGCATATTCATTAG	
sak	223 pb
F: AAGGCGATGACGCGAGTTAT	
R: GCGCTTGGATCTAATTCAAC	
sea	344 pb
F: AGATCATTCGTGGTATAACG	
R: TTAACCGAAGGTTCTGTAGA	
sep	196 pb
F: AATCATAACCAACCGAATCA	
R: TCATAATGGAAGTGCTATAA	

Las condiciones de amplificación para las cinco PCRs fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94ºC, 3 min); 30 ciclos (94ºC, 30 seg; 53ºC, 30 seg y 72ºC, 2 min) y elongación final (72ºC, 6 min).

Atendiendo a la combinación de los genes anteriores presentes en las cepas estudiadas, se clasificaron en diferentes tipos de IEC (**Figura 30**).

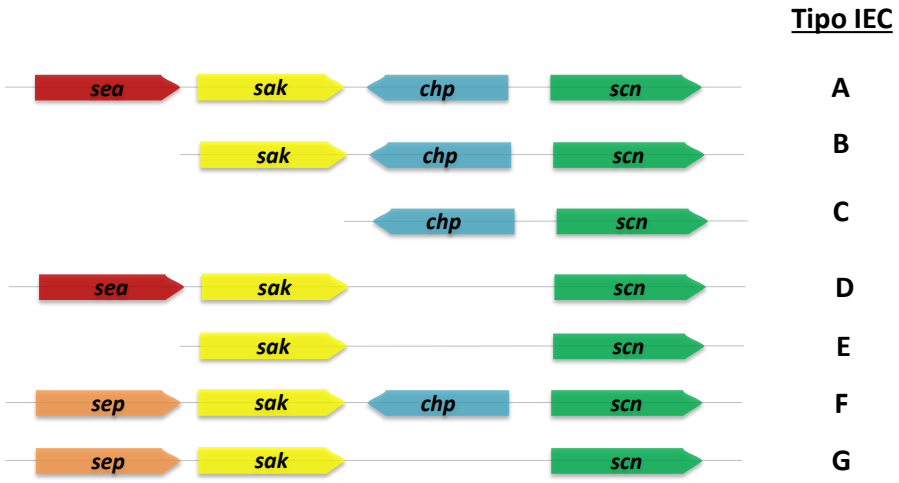


Figura 30. Diferentes tipos de IEC, atendiendo a la combinación de los genes estudiados (tomada de van Wamel *et al*., 2006).

13. ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES. ESTUDIO DEL CONTENIDO EN BACTERIÓFAGOS.

Se realizó el estudio del contenido en fagos de algunas de las cepas estudiadas mediante PCR y secuenciación con el fin de amplificar las integrasas de seis familias seleccionadas de fagos y conocer tras la secuenciación los tipos concretos de cada familia de fagos que habían infectado a las cepas, transfiriéndoles algún tipo de elemento genético móvil (MGE).

Tabla 35. Secuencia de los cebadores empleados para la detección de las integrasas de cada familia de fagos (Goerke *et al., 2009*)

Cebadores (secuencia 5´→3´)	**Tamaño del amplicón**
Integrasa familia 1-Saintϕ1- F: AGCACAAGCTTGCCAACATCG R: TTAATATTTACTTTTTAGTGC	569 pb
Integrasa familia 2-Saintϕ2- F: TTTACTTTTGAACCGTTTCCTAC R: CGTCCTGAATTCTTAGTATGCATATTCATTAG	640pb
Integrasa familia 3-Saintϕ3- F: AAGGCGATGACGCGAGTTAT R: GCGCTTGGATCTAATTCAAC	475 pb
Integrasa familia 5-Saintϕ5- F: AGATCATTCGTGGTATAACG R: TTAACCGAAGGTTCTGTAGA	375pb

Continuación Tabla 35. Secuencia de los cebadores empleados para la detección de las integrasas de cada familia de fagos (Goerke *et al., 2009*)

Integrasa familia 6 -Saintϕ6-	
F: AATCATAACCAACCGAATCA	167 pb
R: TCATAATGGAAGTGCTATAA	
Integrasa familia7 -Saintϕ7-	214 pb
F: AATCATAACCAACCGAATCA	
R: TCATAATGGAAGTGCTATAA	

Las condiciones de amplificación para todas las PCRs fueron las siguientes: desnaturalización inicial (95ºC, 15 min); 35 ciclos (95ºC, 30 seg; 55ºC, 60seg y 72ºC, 45 seg) y elongación final (72ºC, 10 min).

14. SECUENCIACIÓN

Se empleó esta técnica para identificar especies bacterianas, confirmar la presencia de determinados genes de resistencia y virulencia, estudiar cambios nucleotídicos y aminoacídicos, determinar los genes de las integrasas de fagos *Saintφ* en el estudio de detección de fagos y tipar molecularmente las cepas mediante tipo de *spa* y MLST.

Purificación del producto de PCR

En algunos casos los productos de PCR fueron purificados antes de secuenciarse empleando el kit "GFX™ Polymerase Chain Reaction DNA Purification Kit" (AmershamBiosciences). En otros casos la purificación la llevó a cabo en la empresa encargada de la secuenciación (Cogenics, UnitedKingdom). Finalmente también se llevó a cabo la purificación directa del gel mediante el kit "QIAquick GEL Extraction" (Qiagen).

Reacción de secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo, en la mayor parte de los casos, por la empresa Cogenics (United Kingdom) la cual utiliza un sistema automático ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Análisis de las secuencias

Para el análisis de las secuencias se emplearon diversas herramientas bioinformáticas a través de diferentes páginas web:

- ✓ Attotron Biosensor Corporation: para el formateo de las secuencias.

  http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm

- ✓ EMBL-EBI (EuropeanBioinformaticsInstitute): para el alineamiento y la traducción de la secuencia nucleotídica a secuencia aminoacídica.

  http://www.ebi.ac.uk/Information/tools_sitemap.html

- ✓ BLAST (Basic Local AlignmentSearchTool): para el análisis de las secuencias por comparación con la base de datos GenBank.

  http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

- ✓ Primer-BLAST: para el diseño de cebadores.

  http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

- ✓ MLST (MultilocusSequenceTyping): para el estudio de las secuencias tipo (STs).

  http://www.mlst.net/databases/default.asp

- ✓ ORF Finder (Open Reading FrameFinder): para localizar ORFs en las secuencias con características especiales.

  http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/

Para el análisis de la secuencias de la región polimórfica del gen *spa* se utilizó el programa informático "RidomStaph-Type" versión 1.5.21 (RidomGmbH). Para el estudio de los cromatogramas de las diferentes secuencias se empleó el programa Chromas 1.5 (Conor McCarthy).

15. ESTUDIO DE LA VIRULENCIA A TRAVÉS DE UN MODELO ANIMAL DE PATOGÉNESIS. ENSAYO DE SUPERVIVENCIA/MUERTE EN *Caenorhabditis elegans*.

Para llevar a cabo este ensayo se realizó una estancia en el Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva localizada en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) en Madrid, bajo la supervisión y colaboración del Dr. Alfonso Navas y la Dra Susana Corbacho. El material utilizado, así como el protocolo seguido se detallan a continuación:

Preparación de *C. elegans* (figura 31)

Se realizó el crecimiento masivo de *C. elegans* WT (wild type) en placas de petri con medio PDA (Potato Dextrosa Agar, CONDA) durante 48/72 horas. Una vez alcanzada una población adecuada, se cortó el agar en trozos y se suspendieron encima de un recipiente con un filtro de 90 µm en la parte superior y se enrasó con agua corriente. Se dejó decantar durante 18/24 horas con el fin de que los nematodos pasasen a través del filtro y quedasen en el agua (separados del agar). Tras esto, se hizo pasar el volumen de agua por un filtro de 25 µm con el fin de retener a los nematodos. Una vez tuvimos los nematodos separados, se suspendieron en una solución de agua corriente/agua destilada y se añadió 10 µl/ml de una solución antibiótica/antimicótica para evitar contaminaciones (10U penicilina, 10 mg estreptomicina y

25 µg de amphotericina B). Se dejaron incubar los nematodos y la solución antimicrobiana durante 30/45 minutos. Tras esto y tras un corto lavado con agua destilada, los nematodos estuvieron listos para la siguiente fase.

Preparación de las cepas *S. aureus* (figura 31)

Partiendo de un cultivo puro de *S. aureus,* se realizó la siembra del microorganismo con el fin de conseguir un tapiz o césped bacteriano. Se prepararon 5 placas iguales con cada una de las cepas que se iban a testar.

Realización del ensayo de patogenicidad

Se inocularon 5 hembras adultas de *C. elegans* en cada una de las 5 repeticiones de las cepas de *S. aureus* a testar y se incubaron durante 24 horas. Tras la incubación se realizó un recuento con ayuda de una lupa-microscopio. Se anotaron los nematodos vivos, muertos y los huevos. Se realizó la misma operación en un intervalo de 96/120 horas, con lecturas cada 24 horas y siempre a la misma hora del día.

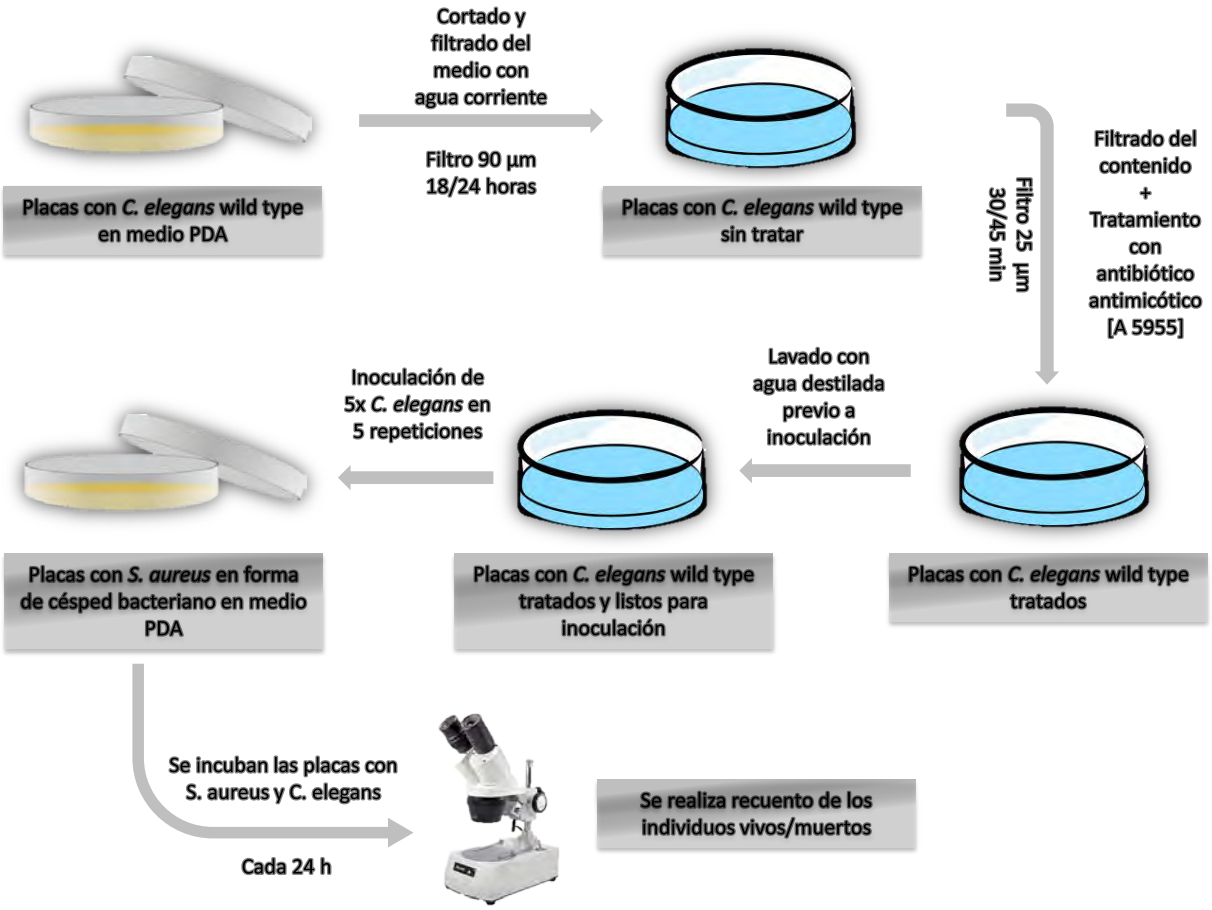


Figura 31. Protocolo de preparación de ensayo de patogenicidad (muerte/supervivencia) de *C. elegans* en placas de *S. aureus*

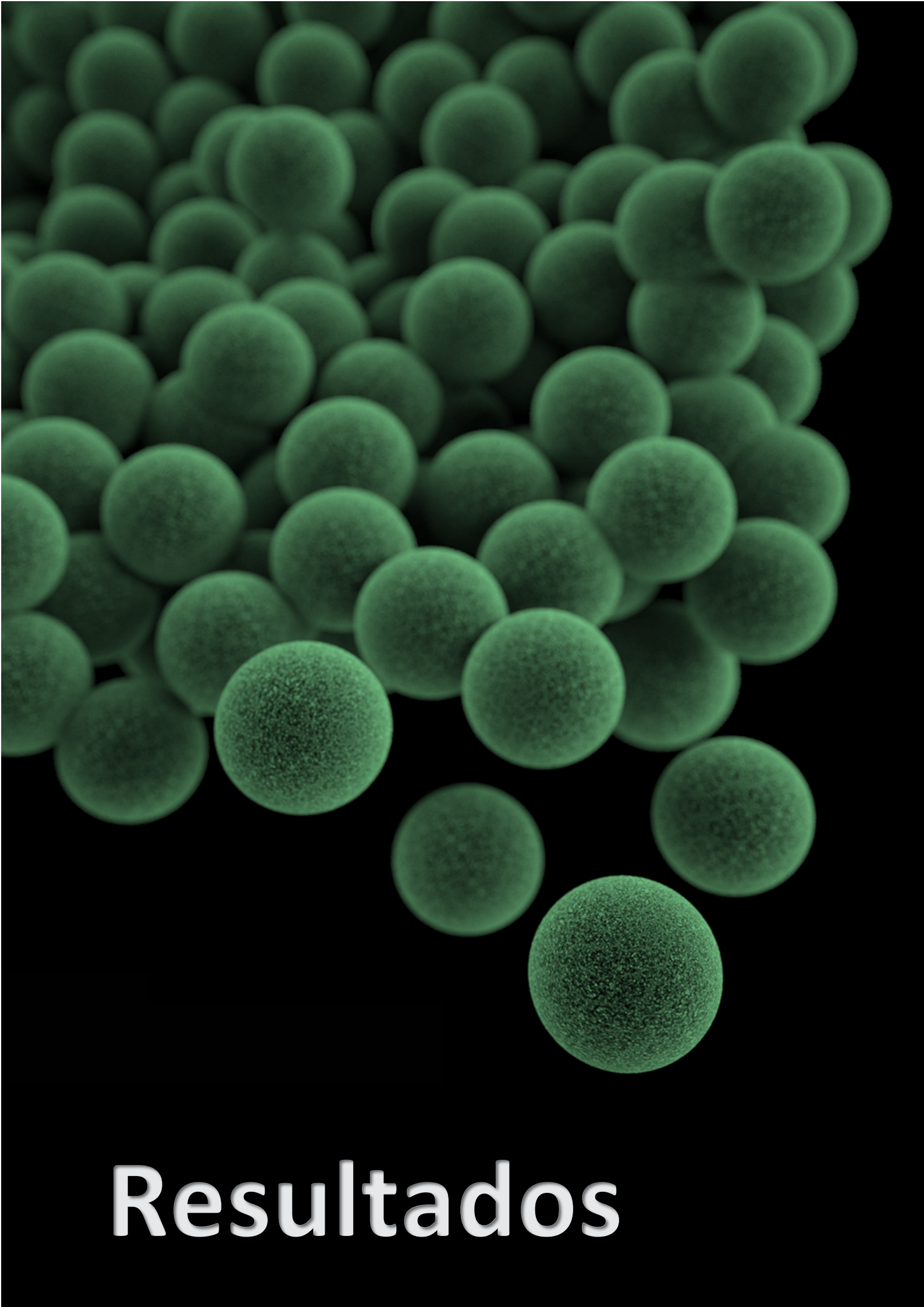
Realización del ensayo de patogenicidad

De los resultados obtenidos se catalogó la diferente patogenicidad producida por cada línea genética en 4 tipos distintos definidos de la siguiente manera:

- ✓ Patogenicidad alta (tasa de supervivencia inferior al 25% a las 72h) → A
- ✓ Patogenicidad intermedia-alta (tasa de supervivencia entre el 25-50% a las 72 h) → IA
- ✓ Patogenicidad intermedia-baja (tasa de supervivencia entre el 50-75% a las 72h) → IB
- ✓ Patogenicidad baja (tasa de supervivencia superior al 75% a las 72h) → B

Tratamiento de los datos mediante programas estadísticos

Con ayuda del programa Statistica (Statsoft 1996, v.6), se realizó el análisis de todos los datos obtenidos mediante un análisis factorial por correspondencias (análisis multivariante descriptivo).



Resultados

“El día en que el hombre se dé cuenta de sus profundas equivocaciones, se habrá acabado el progreso de la ciencia”

Marie Curie (Química y Física)

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE AISLADOS CLÍNICOS DE *S. aureus* IMPLICADOS EN DIFERENTES PATOLOGÍAS

1.1. SARM del Hospital Royo Villanova de Zaragoza (RV-Z)

En primer lugar se procedió a la caracterización de 144 SARM obtenidos en el Hospital RV-Z, aislados de hemocultivos (39 cepas, periodo 2007-2011), y de otros origenes (105 cepas, periodo 2010-2012), con el fin de estudiar comparativamente las líneas genéticas circulantes en ambos tipos de aislados, sus fenotipos de resistencia, perfiles de virulencia, y el tipo IEC.

SARM procedentes de hemocultivos

De un total de 111 cepas de *S. aureus* obtenidas de hemocultivos en el Hospital RV-Z en el período 2007-2011, se seleccionaron las 39 que presentaron un fenotipo SARM, lo que representó un 35,1% del total de aislados de *S. aureus*. En la **figura 32** se observa la evolución del número de aislamientos SARM y SASM en hemocultivos a lo largo del periodo de estudio. La prevalencia de SARM en los años estudiados fue la siguiente: 25% en 2007, 38,8% en 2008, 33,3% en 2009, 40,7% en 2010 y 36,3% en 2011.

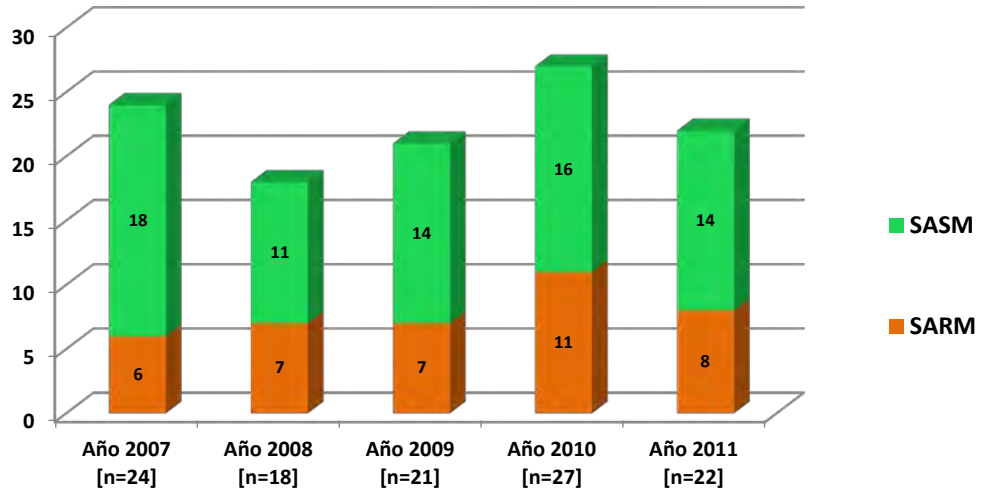


Figura 32. Número de cepas SARM y SASM obtenidas respecto del total de *S. aureus* durante el período 2007/2011.

Se procedió al tipado *spa* de las 39 cepas SARM y se detectaron 8 tipos *spa* diferentes, que en concreto fueron los siguientes (número de cepas): t067 (26), t002 (5), t2220 (2), t2226 (2), t032 (1), t109 (1), t1490 (1), y t7892 (1), siendo este último un nuevo tipo que fue agregado a la base de datos Ridom Spa Server.

Se realizó el tipado por MLST de una cepa por cada tipo *spa* diferente, encontrándose 5 secuencias tipo diferentes: ST125, ST5, ST22, ST88, y ST228. Las cepas en las que no se determinó el ST, fueron asignadas a éstas mismas secuencias tipo por comparación de sus tipos *spa*. Así, se determinó que las 39 cepas estaban adscritas a las siguientes secuencias tipo y complejos clonales (ST/CC (nº de cepas)): ST125-ST5/CC5 (36 aislados, 92,3%), ST22/CC22 (2,5%), ST88/CC88 (2,5%), y ST228/CC228 (2,5%) (**Figura 33**). Se detectaron 3 tipos de locus *agr*, siendo el *agr* II el más prevalente (detectado en 37 de las 39 cepas estudiadas) y el *agr* I y *agr* III, detectado en una cepa SARM cada uno. En todas las cepas adscritas a los complejos clonales CC5, CC22 y CC88, el tipo SCC*mec* encontrado fue el SCC*mec* IV (con distintos subtipos: ST125, subtipo IVc, ST22, subtipo IVa; y CC88, subtipo IVd). Por otra parte, la cepa del complejo clonal CC228 presentó el tipo SCC*mec*I (**Tabla 36**).

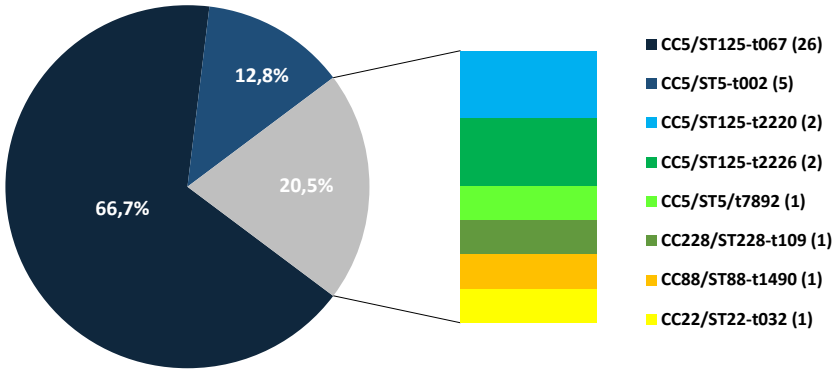


Figura 33. Líneas genéticas detectadas entre las 39 cepas SARM aisladas de hemocultivos en base al tipo *spa* y al ST.

Los porcentajes de cepas SARM de hemocultivos resistentes a los distintos antimicrobianos testados fueron los siguientes: ciprofloxacino (100%), kanamicina (82%), tobramicina (72%), gentamicina (13%), estreptomicina (8%), eritromicina (67%), clindamicina (21%), mupirocina (15%), cloranfenicol (5%) y tetraciclina (3%) (**Figura 34**). Destaca la detección de un fenotipo de multirresistencia en la mayoría de las cepas de la línea genética t067-ST125/CC5, con presencia de mecanismos de resistencia a quinolonas (mutaciones en *gyrA* y *grlA*), y de genes de resistencia a aminoglucósidos (*ant(4´)*-Ia, *aph(3´)*-IIIa, *aac(6´)-Ie-aph(2")*) y macrólidos (*msr(A), msr(B), mph(C)*), además de la resistencia a meticilina. En algunas de estas cepas también se detectó, aunque en menor medida, perfiles de resistencia asociados de manera conjunta a lincosaminas-macrólidos (*erm(A), erm(C)*), mupirocina (*mup*(A)) y cloranfenicol (cat_{pc221}). Perfiles de resistencia parecidos se encontraron entre las cepas tipadas como t2220 o t2226-ST125/CC5. Se observó que, en general, el resto de líneas genéticas existentes entre éstos aislados SARM, tipados como t002-ST5/CC5, t032-ST22/CC22,

o t1490-ST88/CC88, presentaban un fenotipo de resistencia mucho más reducido, aunque destaca la detección del gen *tet*(K) en la cepa adscrita al complejo clonal CC88, (**Tabla 36**).

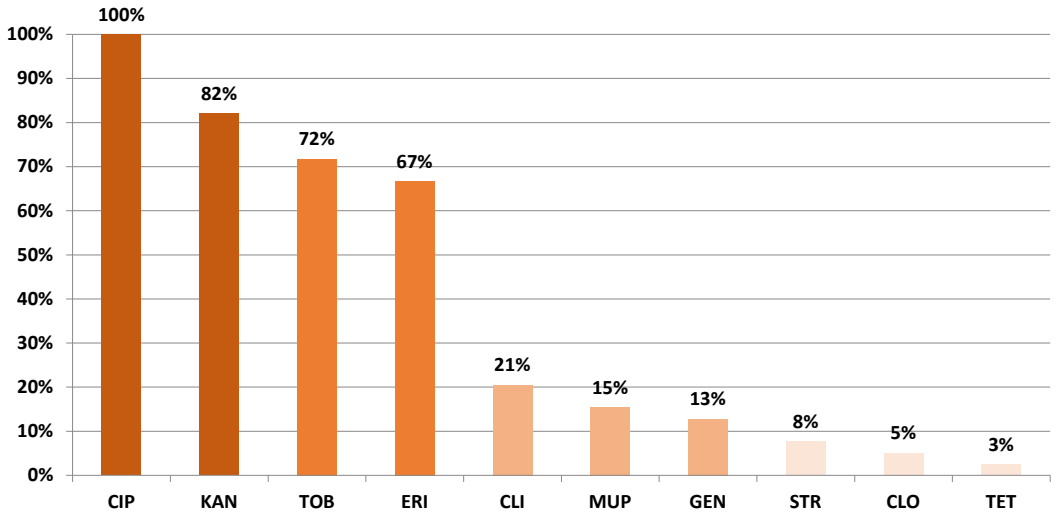


Figura 34. Porcentaje de resistencia a antibióticos detectados en las 39 cepas SARM de hemocultivos del Hospital RV-Z. CIP, ciprofloxacino; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; MUP, mupirocina; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; CLO, cloranfenicol; TET, tetraciclina

Dado que todas las cepas del estudio presentaban resistencia a ciprofloxacino, se estudiaron las mutaciones existentes en los genes codificantes de la ADN topoisomerasa IV (GrlA) y ADN girasa (GyrA), encontrándose el doble cambio aminoacídico S80F (GrlA) y S84L (GyrA) como mecanismo más frecuente. En tres de las cepas, dos de ellas pertenecientes a la línea genética ST125/CC5 y la otra a ST5/CC5, se encontró también un segundo cambio aminoacídico en la secuencia GrlA (E84K) (**Tabla 36**).

Tabla 36.- Caracterización molecular de las 39 cepas SARM procedentes de hemocultivos del Hospital RV-Z incluídas en éste estudio.

Nº cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos			Factores de virulencia	
	MLST/CC[a]	*spa*-type	*agr*	SCC*mec*	Fenotipo[b,c]	Genotipo[c]	Mutaciones[c,d]	IEC[c,e]	Otros genes[c]
26	ST125/CC5	t067	II	IVc	CIP, ERI[21], CLI[6], KAN[25], TOB[24], GEN[2], STR[1], MUP[3], CLO[2]	*msr(A)*[16], *msr(B)*[15], *mph(C)*[10], *erm(A)*[4], *erm(C)*[4], *aph(3´)-IIIa*[17],*ant(4´)-Ia*[23],*aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*[2], *mup(A)*[2], cat_{pc221}[2]	S80F, E84K[2], S84L	F[20]	*tsst-1*[1], *hlA*[25], *hlB*[20], *hlD, hlGv,luk-DE*
4	ST125/CC5	t2220[2]/t2226[2]	II	IVc	CIP, ERI[1], KAN[3], TOB[2], MUP[2]	*msr(A)*[1], *msr(B)*[1], *aph(3´)-IIIa*[1], *ant(4´)-Ia*[1], *mup(A)*[1]	S80F, S84L	F[2]	*hlA, hlB*[2]*, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST125/CC5	t7892	II	IV	CIP, STR	Negativo	Negativo	A	*pvl, hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
5	ST5/CC5	t002	II	IV	CIP, ERI[3], CLI[1], KAN[3], TOB[1]	*msr(A)*[2], *msr(B)*[2], *erm(T)*[1], *aph(3´)-IIIa*[2], *ant(4´)-Ia*[1]	S80F,E84K[1], S84L	E[1], F[3]	*hla, hlB, hlGv, luk-DE*
1	ST88/CC88	t1490	III	IVd	CIP, TET	*tet(K)*	S80F, S84L	G	*pvl hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST228/CC228	t109	II	I	CIP, ERI, CLI, KAN, TOB, GEN, STR, MUP	*mph(C), erm(A), aph(3´)-IIIa, aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*	S80F, S84L	D	*hlA, hlB, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST22/CC22	t032	I	IVa	CIP	-------	S80F, S84L	B	*hlA, hlB, hlD, hlG, luk-DE*

[a] Se determinó el MLST en una cepa de cada uno de los diferentes tipos *spa* detectados. En el resto de las cepas se asumió el ST en función de los tipos *spa* de las cepas.

[b] Antibióticos: CIP, ciprofloxacino; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; MUP, mupirocina; CLO, cloranfenicol

[c] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

[d] Cambios aminoácidicos en las *proteínas* GrlA y GyrA

[e] Tipos IEC (genes detectados): A (*scn, chp, sak, sea*), B (*scn, chp, sak*), D (*scn, sak, sea*), E (*scn, sak*), F (*scn, chp, sak, sep*) y G (*scn, sak, sep*)

En lo que respecta al perfil de virulencia, todas las cepas presentaron la mayoría de genes codificantes de hemolisinas con los siguientes resultados (nº de cepas): *hlA* (38), *hlB* (19), *hlD* (39), *hlG* (1), y *hlGv* (38). La hemolisina γ sólo se encontró en la cepa t032-ST22/CC22. Destaca la detección de la toxina LPV (codificada por el gen *pvl*) en dos de las cepas tipadas como t1490-ST88/CC88 y t7892-ST125/CC5, lo que representa un 5,1% del total de cepas SARM de hemocultivos. Asímismo, se encontró el gen codificante de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*) en una de las cepas t067-ST125/CC5. La presencia del gen de la leucocidina *luk-DE* fue detectada en todos los aislados (**Tabla 36**).

En resumen podríamos decir que la línea genética mayoritaria encontrada entre los aislados SARM de hemocultivos fue t067-ST125/CC5, representando un 66,7% del total de aislados SARM. Dicha línea genética presenta generalmente un fenotipo de multirresistencia. Cepas que por otra parte presentaron una alta clonalidad mediante el estudio de PFGE presentándo un único patrón electroforético o patrones estrechamente relacionados.

SARM procedentes de otros orígenes

Por otro lado se llevó a cabo la caracterización molecular de 105 cepas clínicas SARM aisladas de otros orígenes diferentes a hemocultivos en el Hospital RV-Z, en el periodo 2010-12. De estas cepas, 46 (43,8%) procedían de muestras de control epidemiológico (frotis nasales, inguinales, axilares), mientras que las otras 59 (56,2%) procedían de muestras con significación clínica (heridas quirúrgicas, lesiones en piel y mucosas o infecciones respiratorias o urinarias).

Entre los 105 aislados caracterizados se encontraron 21 tipos de *spa* diferentes, encontrándose en la siguiente proporción (tipo de *spa* (nº de cepas)): t067 (39), t2220 (23), t109 (10), t002 (8), t2226 (3), t008 (3), t7892 (2), t127 (2), t011 (2), t5173 (1), t1084 (1), t068 (1), t032 (1), t432 (1), t1911 (1), t108 (1), t214 (1), t4235 (1) y los nuevos tipos *spa* detectados por primera vez en este estudio: t9907 (1), t9909 (1) y t10486 (2), que fueron incorporados a la base de datos de Ridom Spa Server. Asímismo estos tipos de *spa* fueron adscritos a los siguientes ST/CC (*spa*-ST/CC (% cepas)): t067 o t1084 o t2220 o t2226 o t7892 o t9907-ST125/CC5 (65,6%), t109 o t10486-ST228/CC228 (11,5%), t002 o t214 o t9909-ST5/CC5 (9,5%), t008 o t068 o t1911 o t5173-ST8/CC8 (5,8%), t011 o t108-ST398/CC398 (2,9%), t127-ST1/CC1 (1,9%), t032 o t432-ST22/CC22 (1,9%) y t4235-ST152/CC152 (<1%), (**Figura 35**).

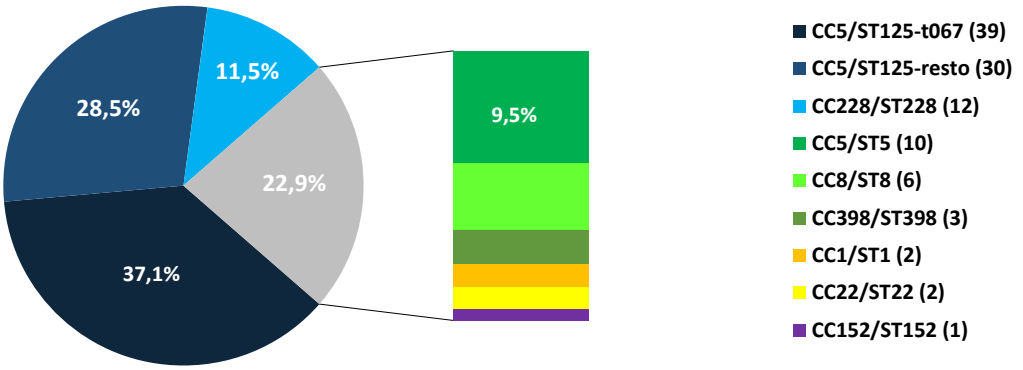


Figura 35. Líneas genéticas detectadas entre las 105 cepas clínicas SARM aisladas de diferentes localizaciones (no hemocultivos) en el Hospital RV-Z, en base al tipo *spa* y al ST.

Aunque la proporción de líneas genéticas no cambia significativamente si consideramos por separado a las cepas de control epidemiológico y las de significación clínica con respecto a la línea mayoritaria (ST125/CC5), sí encontramos una mayor variabilidad entre las cepas SARM causantes de cuadros clínicos, siendo exclusivas de este grupo las cepas adscritas a los complejos clonales CC22, CC398 y CC152. Además una de las variantes adscritas al CC5, sólo aparece en éste último grupo de cepas (concretamente las cepas tipadas como t002 o t214 o t9909-ST5/CC5). En la **figura 36 y en la tabla 37** podemos ver la proporción de las diferentes líneas genéticas encontradas con respecto al tipo de muestra y a los orígenes mayoritarios y su caracterización molecular completa, respectivamente.

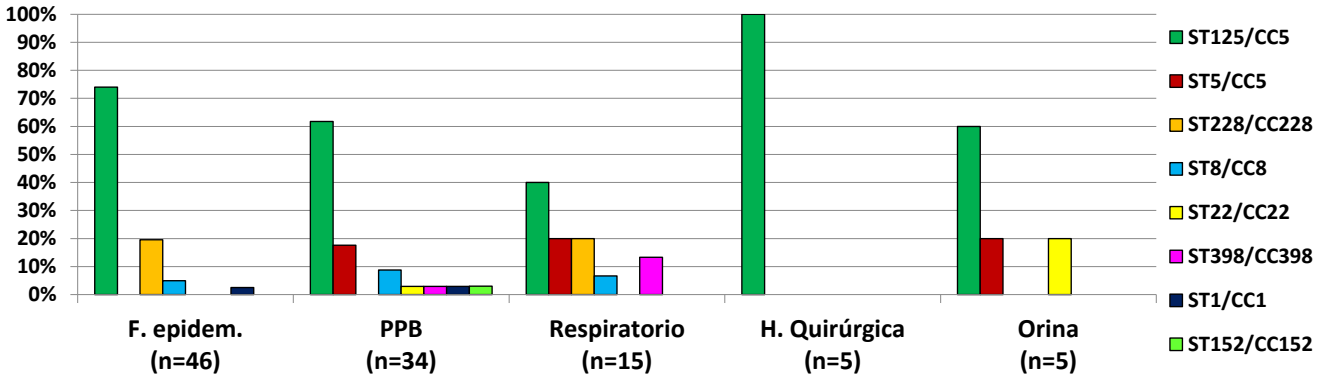


Figura 36. Líneas genéticas detectadas entre las 105 cepas SARM aisladas de diversos orígenes (excepto hemocultivos) en el Hospital RV-Z, en relación al origen de las muestras. (F.epidem: frotis epidemiológico; PPB: piel y partes blandas; H. Quirúrgica: herida quirúrgica)

En las 105 cepas SARM se detectaron 2 locus *agr* diferentes, siendo el más prevalente el *agr* II (92 cepas), seguido del *agr* I (13 cepas). El tipo de SCC*mec* mayoritariamente encontrado fue el SCC*mec* IV (subtipo IVc en el caso de las cepas ST125 y IVa para las cepas ST22 y algunas de las cepas adscritas al ST8), seguido del SCC*mec* I presente en las cepas ST228.

Los porcentajes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas procedentes de diferentes orígenes fueron los siguientes (% cepas resistentes): ciprofloxacino (93,3%), kanamicina (78,1%), tobramicina (57,2%), gentamicina (11,4%), estreptomicina (25,7%), eritromicina (68,6%), clindamicina (22,9%), mupirocina (19,1%), cloranfenicol (3,8%), tetraciclina (5,7%), ácido fusídico (2,9%) y trimetoprim-sulfametoxazol (<1%).

Si consideramos las cepas con significación clínica por separado de las de control epidemiológico encontramos algunas diferencias a nivel de resistencia a antibióticos (**Figura 37**). Las tasas de resistencia a mupirocina y estreptomicina destacan entre los aislados de control epidemiológico con un 32,6% en ambos antibióticos, mientras que entre las cepas con significación clínica, éstos porcentajes disminuyen al 8,5% para la mupirocina y al 20,3% en el caso de la estreptomicina. Por el contrario, sólo aparecen resistencias a ácido fusidico y trimetoprim-sulfametoxazol en el caso de las cepas con significación clínica en tasas del 5,1% y 1,7%, respectivamente. En general, se observan tasas de resistencia algo más elevadas entre los aislados de control epidemiológico, especialmente en lo relativo a los aminoglucósidos y macrólidos.

En cuanto a los perfiles de virulencia de las 105 cepas SARM, en general presentaron la mayoría de genes de hemolisinas, siendo los más prevalentes *hlA* y *hlGv*, excepto para las 4 cepas de los complejos clonales CC1 y CC398 que fueron las únicas con la primera variante de la hemolisina gamma, *hlG.* Cabe destacar la detección del gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*) en 2 cepas tipadas como t067 o t2220-ST125/CC5. Asímismo, es remarcable la detección del gen de la leucocidina de Panton Valentine (*pvl*) en otras 2 cepas pertenecientes a las líneas genéticas t7892-ST125/CC5 y t5173-ST8/CC8. El gen codificante de la exfoliatina A (*eta*) fue detectado en una de las cepas t109-ST228/CC228.

En resumen, la línea genética más prevalente en este tipo de aislados clínicos SARM fue t067-ST125/CC5, representando un 37,1% del total. El resto de cepas adscritas al ST125/CC5, pero con tipos *spa* diferentes a t067, suponen el 28,5% del total y las cepas pertenecientes a ST5/CC5 representan un 9,5%, habiendo sido aisladas estas últimas en muestras con significación clínica. Todas las cepas pertenecientes al complejo clonal CC5 presentaban un fenotipo de multirresistencia a antibióticos. Aunque de forma más discreta, se detecta la línea ST228/CC228, representando un 11,5% del total, siendo más prevalente en este caso, entre las cepas de control epidemiológico y destacando por ser resistentes a mupirocina en más de un 90% de ellas, además de presentar un fenotipo de multirresistencia similar al de las CC5 (**Tabla 37**).

Tabla 37.- Caracterización molecular de las 105 cepas SARM aisladas en el Hospital RV-Z, consideradas en función del origen de la muestra.

Nº cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
	MLST/CC[a]	*spa*-type	*agr*	SCC*mec*	Fenotipo[b,c]	Genotipo[c]	IEC[c,d]	Otros genes[c, e]
FROTIS CONTROL EPIDEMIOLÓGICO								
17	ST125/CC5	t067	II	IVc	CIP, ERI[14], CLI[1], KAN, TOB[14], GEN[2], STR[2]	*msr(A)*[11], *msr(B)*[10], *mph(C)*[11], *erm(A)*[1], *aph(3´)-IIIa*[15],*ant(4´)-Ia*[11],*aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*[2]	F[14]	***tsst-1***[1],*hlA, hlB*[7], *hlD*[11], *hlGv,luk-DE*
15	ST125/CC5	t2220[10]/t2226[3], t1084[1], t9907[1]	II	IVc	CIP[14], ERI[10], CLI[2], KAN[11], TOB[7], STR[4], MUP[7]	*msr(A)*[10], *msr(B)*[7], *mphC*[9],*erm(C)*[2], *aph(3´)-IIIa*[9], *ant(4´)-Ia*[6], *ant(6´), mup(A)*[7]	F[7]	*hlA, hlB*[2], *hlD, hlGv, luk-DE*
2	ST125/CC5	t7892	II	IV	Negativo	Negativo	A	***pvl,****hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
9	ST228/CC228	t109[7], t10486[2]	II	I	CIP, ERI, CLI[8], KAN, TOB[4], GEN[4], STR, MUP[8]	*msr(A)*[2], *msr(B)*[2], *mph(C)*[3],*erm(A)*[7], *erm(C)*[1], *aph(3´)-IIIa, ant(4´)-Ia*[2], *aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*[4], *ant(6´)*[6], *mup(A)*[5]	D[7]	*hla, hlB, hlGv, luk-DE*
2	ST8/CC8	t008	I	IV	CIP, KAN TOB, CLO	*aph(3´)-IIIa*[1], *ant(4´)-Ia*[1], cat_{pc221}	B	*hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST1/CC1	t127	I	IV	ERI, CLI, TET	*msr(A), mph(C), erm(A), erm(C), tet(M), tet(K), tet(L)*	E	*hlA, hlB, hlD, hlGv, luk-DE*
PIEL Y PARTES BLANDAS								
12	ST125/CC5	t067	II	IVc	CIP, ERI[7], KAN[9], TOB[8], GEN[1], FUS[1], STR[1]	*msr(A)*[7], *msr(B)*[6], *mph(C)*[7], *aph(3´)-IIIa*[9],*ant(4´)-Ia*[4],*aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*[1], *fus (C)*[1], *mup(A)*[1]	F[9]	*hlA, hlB*[3], *hlD*[9], *hlGv, luk-DE*
9	ST125/CC5	t2220	II	IVc	CIP, ERI[6], CLI[1], KAN[7], TOB[2], GEN[1], STR[1]	*msr(A)*[5], *msr(B)*[4], *mphC*[5],*erm(C)*[1], *aph(3´)-IIIa*[7], *ant(4´)-Ia*[3], *aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia*[1]	F	*hlA, hlB, hlD*[6], *hlGv, luk-DE*
6	ST5/CC5	t002[5], t9909[1]	II	IV	CIP, ERI, CLI[2], KAN, TOB	*msr(A), msr(B), erm(C)*[2], *aph(3´)-IIIa, ant(4´)-Ia*	E[2], F[3]	*hlA, hlB*[1], *hlD, hlGv, luk-DE*
3	ST8/CC8	t068[1], t1911[1], t5173[1]	I	IV	CIP[2], ERI[1], CLI[1], KAN[1], TET[1], FUS[1]	*msr(A)*[1], *msr(B)*[1], *mph(C)*[1], *lnu(A)*[1], *aph(3´)-IIIa*[1], *ant(4´)-Ia*[1], *fus(C)*[1]	B[1]	***pvl***[1],*hlA, hlD, hlGv, luk-DE*

Continuación Tabla 37.- Caracterización molecular de las 105 cepas SARM de diferentes orígenes incluidas en el estudio

Nº cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
	MLST/CC[a]	*spa*-type	*agr*	SCC*mec*	Fenotipo[b,c]	Genotipo[c]	IEC[c,d]	Otros genes[c, e]
1	ST22/CC2	t432	I	IV	CIP	Negativo	F	*hlA,, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST398/CC398	t108	I	V	CIP,ERI, CLI, KAN, TOB, GEN, STR, TET, FUS, MUP	*erm(A), erm(C), ant(4´)-Ia, aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia,ant(6´), mup(A), tet(K)*	-	*hlA, hlB, hlD, hlG, luk-DE*
1	ST1/CC1	t127	I	IV	ERI, CLI, STR, TET	*erm(A), erm(C), tet(L), tet(M)*	E	*hlA, hlB, hlD, hlG, luk-DE*
1	ST152/CC152	t4235	I	V	CIP, STR, TET	*tet(k)*	G	*pvl,hlA, hlB, hlGv, luk-DE*
RESPIRATORIO								
3	ST125/CC5	t067	II	IVc	CIP[2], ERI[1], KAN[2], TOB[2], GEN[1],	*msr(A)[1], msr(B)[1], mph(C)[1], aph(3´)-IIIa,ant(4´)-Ia[3],aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia[1]*	F	*hlA, hlB[2], hlD[2], hlGv, luk-DE*
3	ST125/CC5	t2220	II	IVc	CIP, ERI[1], KAN[2], TOB[1], STR[1], CLO[1], SXT[1], MUP[1]	*aph(3´)-IIIa[1], ant(4´)-Ia[1], cat_{pc221}[1],dfr(A)[1], mup(A)[1]*	F	***tsst-1,****hlA, hlB, hlD, hlGv, luk-DE*
3	ST5/CC5	t002[2], t214[1]	II	IV	CIP, ERI[2], CLI[1], KAN[2], GEN[2], TOB[2], STR[1]	*msr(A)[1], msr(B),[1] erm(C)[1], lnu(A)[1], aph(3´)-IIIa[2], ant(4´)-Ia[2], aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia[2]*	E[2], F[1]	*hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
3	ST228/CC228	t109	II	I	CIP, ERI, CLI, KAN, TOB[2], STR, MUP	*msr(A)[1], erm(A), aph(3´)-IIIa[2], ant(4´)-Ia[2], aac(6')-Ie–aph(2'')-Ia[1], ant(6´)[1], mup(A)*	D	***eta[1]****, hlA, hlB[1]hlD, hlGv, luk-DE*
2	ST398/CC398	t011	I	V	CIP, TET, STR	*tet(M), tet(K)*	-	*hlA, hlB, hlD, hlG, luk-DE*
1	ST8/CC8	t008	I	IV	CIP, KAN, TOB	*aph(3´)-IIIa, ant(4´)-Ia*	B	*hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
HERIDAS QUIRÚRGICAS								
4	ST125/CC5	t067	II	IVc	CIP, ERI, CLI[1], KAN, TOB, CLO[1]	*msr(A)[3], msr(B)[3], mph(C)[3], erm(C)[1], aph(3´)-IIIa[3],ant(4´)-Ia[3]*	F	*hlA, hlB[2], hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST125/CC5	t2220	II	IVc	CIP, ERI, KAN	*msr(A), msr(B), mph(C), aph(3´)-IIIa*	F	*hlA, hlB, hlGv, luk-DE*

Continuación Tabla 37.- Caracterización molecular de las 105 cepas SARM de diferentes orígenes incluidas en el estudio

Nº cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
	MLST/CC[a]	*spa*-type	*agr*	SCC*mec*	Fenotipo[b,c]	Genotipo[c]	IEC[c,d]	Otros genes[c, e]
ORINA								
3	ST125/CC5	t067	II	IVc	CIP, ERI, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aph(3´)-IIIa,ant(4´)-Ia*	F	*hlA, hlB*[1]*, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST5/CC5	t002	I	IV	KAN, TOB	*aph(3´)-IIIa,ant(4´)-Ia*	E	*hlA, hlD, hlGv, luk-DE*
1	ST22/CC22	t032	I	IV	CIP, ERI, CLI	*msr(A), mph(C), erm(C)*	F	*hlA, hlD, hlGv, luk-DE*

[a]Se determinó el MLST en una cepa de cada uno de los diferentes tipos *spa* detectados. En el resto de las cepas se asumió el ST en función de los tipos spa de las cepas.

[b]Antibióticos: CIP, ciprofloxacino; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol, MUP, mupirocina; CLO, cloranfenicol; TET, tetraciclina.

[c]El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

[d]Tipos IEC (genes): A (*scn, chp, sak, sea*), B (*scn, chp, sak*), D (*scn, sak, sea*), E (*scn, sak*), F (*scn, chp, sak, sep*) y G (*scn, sak, sep*)

[e]En negrita están marcados aquellos genes de virulencia de especial relevancia clínica

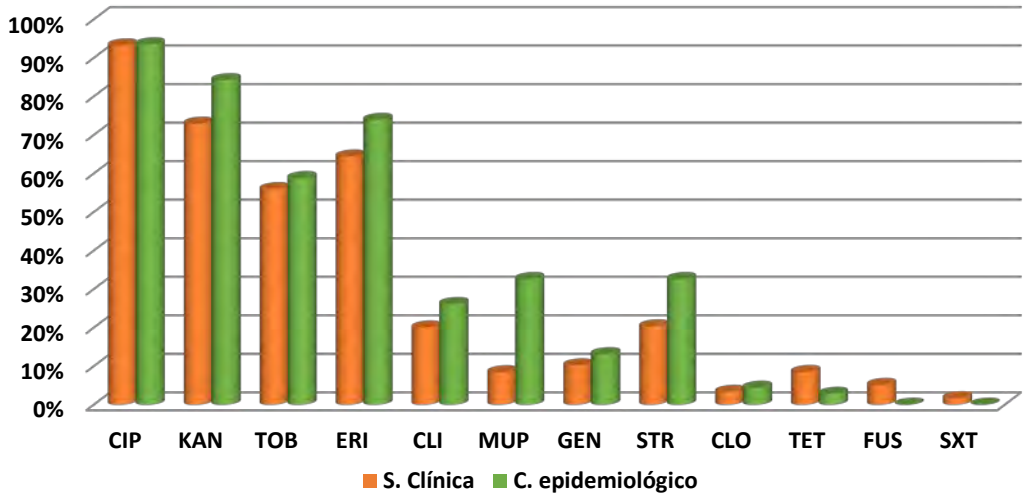


Figura 37. Porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos detectados en las 105 cepas SARM del estudio, considerando por separado las de significación clínica y las de control epidemiológico. CIP, ciprofloxacino; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; MUP, mupirocina; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; CLO, cloranfenicol; TET, tetraciclina; FUS, ácido fusidico; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

1.2. Caso clínico: Forunculosis recurrente familiar por SARM

A continuación se llevó a cabo la caracterización completa de un caso clínico por SARM causante de un proceso de forunculosis recurrente familiar, detectado en el año 2013 en el Hospital RV-Z. En dicho hospital se aislaron 14 cepas SARM, que incluían tanto aislados clínicos del paciente y de su hija, como aislados de colonización nasal del paciente y de los miembros de su familia. Dichas cepas fueron remitidas a la Universidad de La Rioja para su caracterización.

Se trataba del caso de un varón que presentaba un absceso doloroso en la mano derecha, por el cual había acudido a diversos centros de atención primaria con frecuentes recidivas tras diferentes tratamientos con cloxacilina, amoxicilina-clavulánico y levofloxacino, sin mejoría aparente Se contabilizaron hasta 10 recidivas del absceso del caso guía, realizándole drenaje de la lesión y tratándole con amoxicilina-clavulánico. Unos días después, regresó con aparición de otros abscesos en diferentes localizaciones. Tras nuevo drenaje se pautó cloxacilina. Seis días más tarde presentó malestar general con astenia, picos febriles de hasta 39ºC y lesiones abscesificadas y ulceradas en el muslo, pierna y abdomen. Se realizó cultivo de las lesiones de las que se aisló SARM y se decidió pautar levofloxacino ante la falta de respuesta al tratamiento previo.

Se realizó un estudio epidemiológico de la familia conviviente del paciente con el fin de determinar el grado de colonización por SARM y la línea genética causante de la lesión en el caso guía. Se realizó la caracterización molecular de 12 de las 14 cepas aisladas del caso clínico y su entorno familiar que resultaron positivas para SARM: 7 procedentes del paciente (2 de ellas de significancia clínica y otras 5 procedentes de frotis nasal e inguinal), una cepa de su mujer (frotis nasal), y 4 cepas de su hija (3 de ellas de frotis nasal o inguinal y una procedente de un absceso que se produjo durante el estudio) (**Tabla 38**).

Todos los aislados resultaron ser SARM de la línea genética t021-ST30/CC30, *agr* III, SCC*mec* IV, detectándose el siguiente fenotipo de multirresistencia (genes detectados): eritromicina (*msr*(A), *msr*(B), *mph*(C)), trimetoprim-sulfametoxazol (*dfr*(A), *dfr*(G)), ciprofloxacino y cotrimoxazol, además de resistencia a meticilina (*mecA*) y penicilina (*blaZ*). El perfil de virulencia destacaba por contener el gen de la leucotoxina de Panton Valentine (*pvl*) y el de la proteína de unión al colágeno (*cna*). Asímismo, se detectó en las cepas SARM los genes caracteristicos del IEC de tipo B. **(Figura 38).**

Tabla 38.- Cronología de aislamiento de las 12 cepas estudiadas y tipado molecular

Cepa	Individuo	Tipo de muestra	Fecha	Perfil molecular
C6319	Paciente	Abceso muslo	26 de febrero 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6320	Paciente	Nasal	28 de febrero 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6321	Paciente	Frotis Inguinal	28 de febrero 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6322	Paciente	Abceso gemelo	28 de febrero 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6323	Mujer	Nasal	1 de marzo 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6324	Hija	Nasal	1 de marzo 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6328	Hija	Abceso glúteo	8 de marzo 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6329	Paciente	Nasal	18 de marzo 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6400	Hija	Nasal	9 de abril 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6402	Hija	Nasal	2 de mayo 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6401	Paciente	Nasal	8 de mayo 2013	SARM t021-ST30/CC30
C6403	Paciente	Frotis Inguinal	8 de mayo 2013	SARM t021-ST30/CC30

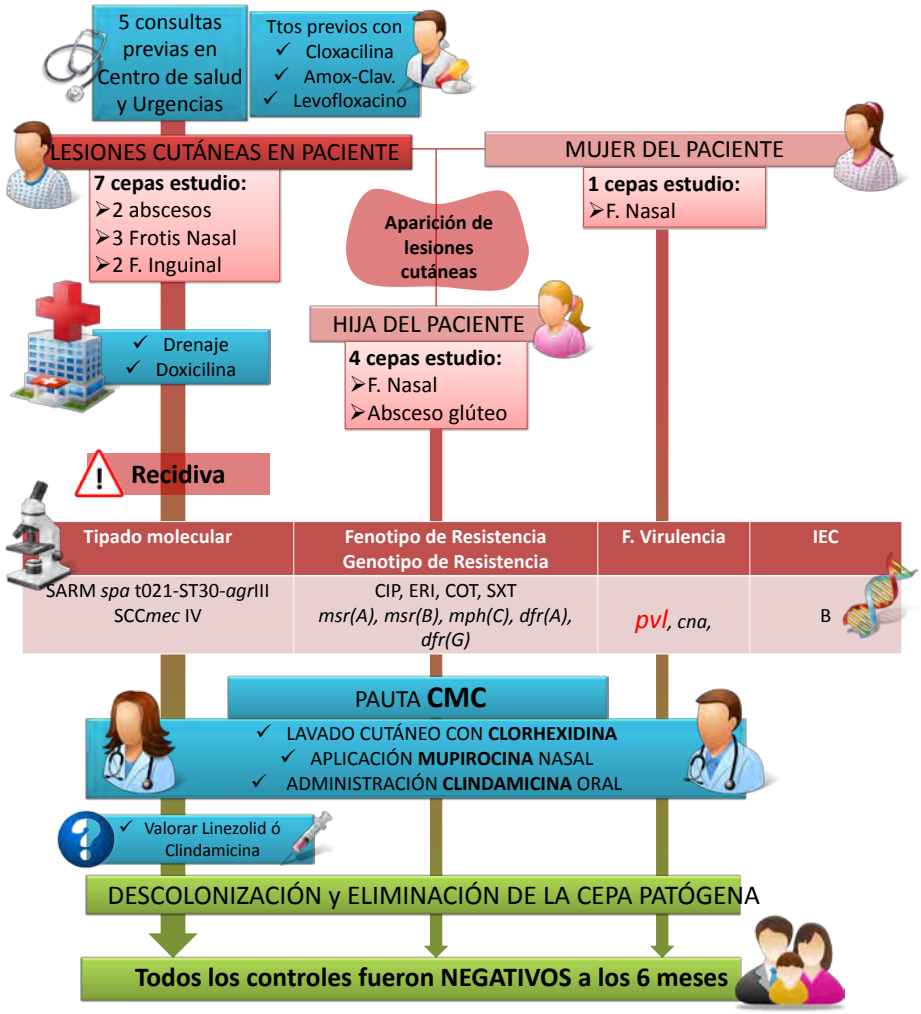


Figura 38. Cronología, evolución y actuación en el caso clínico por forunculosis recurrente

1.3. Aislados de *S. aureus* en pacientes pediátricos con dermatitis atópica (DA)

Una vez analizadas las caracteristicas de las cepas SARM implicadas en diferentes patologías, fue nuestro interés el estudiar las características genéticas de los aislados clínicos de *S. aureus* obtenidos de muestras nasales y cutáneas de pacientes pediátricos con dermatitis atópica (DA). Dicho estudio fue posible gracias a la colaboración con los Facultativos del Hospital Niño Jesús de Madrid, Hospital San Jorge de Huesca y Hospital Royo Villanova de Zaragoza. Se seleccionaron 40 cepas de *S. aureus* procedentes de 35 pacientes pediátricos con DA, y que correspondían a 26 cepas de lesiones cutáneas (65%), y las otras 14 cepas se aislaron a partir de frotis nasales (35%). Se llevó a cabo la caracterización molecular completa de las 40 cepas, incluyendo el tipado molecular, los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos, así como el perfil de virulencia, incluido el tipado IEC. Además, mediante la determinación del SCORAD-"Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) score"- (sistema de catalogación de los distintos grados de severidad de la DA en los pacientes en base a las lesiones causadas dentro del cuadro clínico), se catalogaron a los 35 pacientes en 3 grandes grupos de severidad de DA: patología severa (SCORAD ≥40) detectada en 13 pacientes, patología moderada (SCORAD 15-39) en 20 pacientes y patología leve (SCORAD <15) en 2 de los pacientes.

Todas las cepas incluidas en el estudio fueron sensibles a meticilina (SASM), pero se detectó una gran diversidad genética entre ellas. A continuación se presentan los datos de su caracterización molecular, en función del origen cutáneo o nasal de las mismas.

A) Cepas de origen cutáneo (n=26)

Se detectó una gran diversidad clonal con la identificación de 22 tipos *spa* diferentes que pertenecían a 14 STs distintos, adscritos a 13 complejos clonales [*spa*-ST/CC (nº de cepas)]: t002, t071 o t777-ST5/CC5 (3); t012 o t021-ST30/CC30 (3); t085, t1509, t1877 o t10665-ST15 o ST582/CC15 (4); t015, t3972 o t728-ST45/CC45 (3); t008-ST8/CC8 (3); t088-ST80/CC80 (1); t571-ST398/CC398 (1); t127-ST1/CC1 (1); t209-ST109/CC9 (2); t091 o t803-ST7/CC7 (2); t304-ST6/CC6 (1); t240-ST10/CC10 (1) y t2933-ST22/CC22 (1) (**Tabla 39, Figura 39**). Se detectó un nuevo tipo *spa,* designado t10665, pertenenciente a la línea genética ST15/CC15, que fue añadido a la base de datos Ridom Spa Type. Aunque no se observó una línea genética claramente predominante, el 61,5% de los aislados de origen cutáneo pertenecían a los complejos clonales CC5, CC15, CC30, CC45 y CC8 (**Figura 39).** El locus *agr* más frecuente fue el *agr* I (13 cepas), seguido por el *agr* II (9 cepas) y *agr* III (4 cepas).

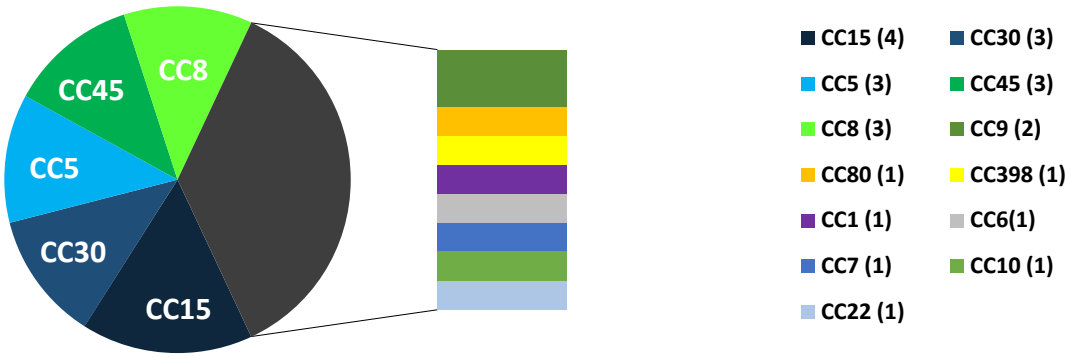


Figura 39. Distribución de CCs detectados en las cepas de *S. aureus* de origen cutáneo de pacientes pediatricos con DA

Respecto a los fenotipos y genotipos de resistencia a antimicrobianos, se obtuvieron los siguientes resultados [% de cepas resistentes/genes detectados]: penicilina [76,9%/*blaZ*], eritromicina [23,1%/*msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *erm*(A), *erm*(T)], clindamicina [11,5%/*erm*(A), *erm*(T)], kanamicina y gentamicina [19,2%/*aac*(6´)-*Ie-aph*(2")], tobramicina [15.4%/*ant*(4´)-*Ia*], mupirocina [19,2%/*mup*(A)] y ácido fusídico [3,8%/no se detectaron genes de resistencia]. Destaca el fenotipo de multirresistencia, fundamentalmente a macrólidos y aminoglucósidos en las cepas pertenecientes a los complejos clonales CC5, CC8, CC9 y CC45, detectándose en dichas cepas gran parte de los genes de resistencia mencionados anteriormente. Además, 5 cepas adscritas a los complejos clonales CC8, CC30 y CC45 (19,2%) mostraron resistencia a mupirocina, encontrándose en dos de ellas el gen *mup*(A) (**Tabla 39**).

En cuanto al perfil de virulencia, destaca la detección del gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*) en 14 cepas (53,8%), el de la proteína de unión al colágeno (*cna*) en 11 cepas (42,3%), el de la exfoliatina A (*eta*) en 3 cepas (11,5%) adscritas a los complejos clonales CC9 y CC15; y el de la enterotoxina C (*sec*) en 2 cepas pertenecientes al complejo CC45. En general, la mayoría de las cepas tenían una combinación de genes de diferentes hemolisinas, siendo las variantes alfa (*hlA*) y gamma (*hlGv*) las más prevalentes. Todas las cepas contenían el gen de la leucocidina Luk-DE (**Tabla 39**).

Las 26 cepas estudiadas de origen cutáneo procedían de 26 pacientes con diferente grado de severidad en relación a su proceso de DA (SCORAD): 13 pacientes con SCORAD severo, 12 pacientes con SCORAD moderadoy 1 paciente con SCORAD leve. Los resultados mostraron una asociación entre las cepas adscritas a los complejos CC5, CC45 y CC398 y un SCORAD severo. Por otro lado, en los pacientes con SCORAD moderado se aisló con más frecuencia *S. aureus* de los complejos CC1, CC8, CC22, CC30 y CC80, aunque con una asociación más clara con CC8 y CC30 (**Tabla 39**).

Tabla 39. Características de las 26 cepas de *S. aureus* aisladas de muestras cutáneas procedentes de pacientes pediátricos con DA.

Nº cepas	Paciente	Tipado Molecular			Resistencia antimicrobianos		Factores de Virulencia		SCORAD[e]
		spa-type[a]	*agr*	MLST/CC[b]	Fenotipo[a,c]	Genotipo[a]	IEC[a,d]	Otros genes	
2	1, 2	t012	III	ST30/CC30	PEN, MUP	*blaZ*	A[1],B[1]	*tsst-1, hlA, hlB, hlGv,luk-DE, aur, cna*	M
1	3	t021	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*tsst-1, hlA, hlB, hlG,luk-DE, aur, cna*	M
1	4	t002	II	ST5/CC5	PEN, ERI	*blaZ, msr(A), msr(B), mphC*	F	*tsst-1, hlA, hlB. hlGv, luk-DE*	S
1	5	t071	II	ST5/CC5	ERI	*msr(A), mph(C)*	F	*tsst-1, hlA, hlB. hlGv, luk-DE, aur*	S
1	6	t777	II	ST5/CC5	ERI, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia*	F	*tsst-1, hlA, hlGv, luk-DE, aur*	S
3	7, 8, 9	t085[1]/t1509[1], t1877[1]	II	ST15/CC15	PEN[2]	*blaZ*[2]	B[1],C[2]	*hlA, hlGv, luk-DE, aur*[1]	L[1], M[1], S[1]
1	10	t10665	II	ST582/CC15	--	--	A	*tsst-1, eta, hlA, hlB. hlGv, luk-DE*	S
2	11, 12	t015[1], t3972[1]	I	ST45/CC45	PEN, GEN, KAN, TOB, MUP	*blaZ, aac(6´)-Ie-aph(2")*[1], *ant(4´)-Ia*[1], *mup(A)*[1]	F	*tsst-1, hlA, hlG luk-DE, sec*[1], *cna*	S
1	13	t728	I	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	F	*hlA, hlB, hlG, luk-DE, sec, cna*	S
3	14, 15, 16	t008	I	ST8/CC8	PEN[1], GEN[2], KAN[2], TOB[1], MUP[1]	*blaZ*[2], *aac(6´)-Ie-aph(2")*[2], *ant(4´)-Ia*[1], *mup(A)*[1]	B[1], F[2]	*tsst-1*[1], *hlA, hlB, hlGv, luk-DE, cna*[1], *aur*[1]	M
1	17	t088	I	ST80/CC80	PEN	*blaZ*	B	*hlA, hlGv, luk-DE*	M
1	18	t571	I	ST398/CC398	PEN, ERI, CLI	*blaZ, erm(T)*	C	*hlA, hlG, luk-DE*	S
1	19	t127	III	ST1/CC1	PEN, ERI, CLI	*blaZ, erm(A)*	A	*tsst-1, hlA, hlG, luk-DE, aur, cna*	M
2	20, 21	t209	II	ST109/CC9	PEN, ERI, CLI[1], FUS[1]	*blaZ, msr(A)*[1],*mphC, erm(A)*[1]	F	*tsst-1*[1], *eta, hlA, hlB, hlGv, luk-DE, aur*	M[1], S[1]
1	22	t304	I	ST6/CC6	PEN	--	A	*eta, hlA, hlB, hlGv, luk-DE, aur, cna*	S
2	23, 24	t091[1], t803[1]	I	ST7/CC7	PEN	*blaZ*	F	*tsst-1*[1], *hlA, hlB, hlGv, luk-DE*	M[1], S[1]
1	25	t240	I	ST10/CC10	PEN	*blaZ*	B	*hlA, hlB, hlG, luk-DE, cna*	S
1	26	t2933	I	ST22/CC22	PEN	*blaZ*	F	*tsst-1, hlA, hlB, hlGv, cna*	M

[a] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

[b] Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de STs se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas

[c] Antimicrobianos: PEN, penicilina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; MUP, mupirocina; FUS, ácido fusídico.

[d] IEC: Immune Evasion Cluster. Tipo A (*scn, chp, sak, sea*); Tipo B (*scn, chp, sak*); Tipo C (*scn, chp*); Tipo E (*scn, sak*); Tipo F (*scn, chp, sak, sep*)

[e] SCORAD: S, severo (≥ 40); M, moderado (entre 15-39); L, leve (< 15)

B) Cepas de origen nasal (n=14)

En las 14 cepas nasales de *S. aureus* de pacientes con DA se detectaron 11 tipos *spa* diferentes, asociados a 9 secuencias tipo distintas pertenecientes a 6 complejos clonales. El 50% de estas cepas pertenecían al complejo clonal CC30, encontrándose 4 secuencias tipo diferentes (ST30, ST34, ST1842, y ST1869), asociadas a 4 tipos *spa* (t012, t021, t136, t1057). El resto de cepas estaban incluidas en las siguientes líneas genéticas [*spa*-ST/CC (nº de cepas)]: t002, t071 o t777-ST5/CC5 (3), t008-ST8/CC8 (1), t1307-ST1952/CC59 (1), t267-ST97/CC97 (1), t5739-ST182/CC182 (1). El alotipo *agr* más frecuente fue el *agr* III (7 cepas), seguido del *agr* I (4 cepas) y del *agr* II (3 cepas) (**Tabla 40, Figura 40).**

Los porcentajes de resistencia a antibióticos y los genes de resistencia detectados en estas cepas fueron los siguientes [% de cepas resistentes/genes detectados]: penicilina [85,7% / *blaZ*], eritromicina [14.3% / *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C)], kanamicina [7,1%] and gentamicina [7,1% / *aac*(6´)-*Ie-aph*(2")]; tobramicina [7,1% / *ant*(4´)-*Ia*], y ácido fusídico [7,1% / no se detectaron genes]. Destaca la detección de una cepa con resistencia a macrólidos y aminoglucósidos, tipada como t777-ST5/CC5 (**Tabla 40**).

Respecto al contenido en factores de virulencia, la prevalencia del gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*) y el de la leucocidina *luk-DE* se sitúan en el 64,3%. Asímismo se detecta el gen de la proteína de unión al colágeno en el 35% de las cepas, especialmente prevalente entre los aislados pertenencientes a los complejos clonales CC30 y CC182. Destaca la detección del gen de la exfoliatina A (*eta*), en la cepa tipada como t1057-ST1842/CC30, y la detección del gen de la enterotoxina B (*seb*) en una cepa adscrita al complejo clonal CC59.

Las 14 cepas de *S. aureus* estudiadas de origen nasal procedían de 14 pacientes con diferente grado de severidad en relación a su proceso de DA (SCORAD): 2 pacientes con SCORAD severo, 11 pacientes con SCORAD moderado y 1 paciente con SCORAD leve. Los resultados mostraron una asociación entre las cepas adscritas a complejo CC5 y una patología severa. Por otro lado, el resto de cepas de otros complejos clonales se aislaron en pacientes con SCORAD moderado o leve (**Tabla 40**).

Como podemos intuir al observar las **figuras 39 y 40**, la variabilidad genética se hace más evidente entre las cepas de origen cutáneo, donde no se observan líneas genéticas especialmente prevalentes, al contrario de lo que sucede con las cepas de origen nasal, donde las cepas pertenencientes al complejo CC30 son prevalentes (50% en relacion al resto de clones).

Tabla 40. Características de las 14 cepas de *S. aureus* aisladas de frotis nasales procedentes de pacientes pediátricos con DA

Nº cepas	Paciente	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia		SCORAD[e]
		spa-type[a]	*agr*	MLST/CC[b]	Fenotipo[a,c]	Genotipo[a]	IEC[a,d]	Otros genes	
3	1, 2, 27	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A[1], B[2]	*tsst-1, hlA, hlB*[1]*, hlG, luk-DE*[1]*, aur, cna*	M
1	3	t021	III	ST30/CC30	PEN, FUS	*blaZ*	A	*tsst-1, hlA, hlG, aur, cna*	L
1	28	t021	III	ST1869/CC30	PEN	*blaZ*	A	*hlA, hlB, hlG, luk-DE, cna*	M
1	29	t1057	III	ST1842/CC30	PEN	*blaZ*	F	*tsst-1, eta, hlA, hlB, hlG, luk-DE, aur*	M
1	30	t136	III	ST34/CC30	PEN	--	E	*tsst-1, hlA, hlG, aur*	M
1	31	t002	II	ST5/CC5	PEN	*blaZ*	F	*tsst-1, hlA, hlGv, luk-DE*	M
1	5	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msr(A), mph(C)*	F	*hlA, hlGv, luk-DE, aur*	S
1	6	t777	II	ST5/CC5	ERI, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6´)-Ie-aph(2”), ant(4´)-Ia*	F	*hlA, hlGv, luk-DE, aur*	S
1	32	t008	I	ST8/CC8	PEN	--	B	*hlA, hlGv, luk-DE, aur*	M
1	33	t267	I	ST97/CC97	PEN	*blaZ*	B	*tsst-1, hlA, hlG, luk-DE*	M
1	34	t1307	I	ST1952/CC59	PEN	*blaZ*	F	*hlA, hlB, hlGv, luk-DE, seb*	M
1	35	t5739	I	ST182/CC182	PEN	*blaZ*	B	*tsst-1, hlA, hlGv, aur, cna*	M

[a] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

[b] Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas

[c] Antimicrobianos: PEN, penicilina; ERI, eritromicina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; FUS, ácido fusídico.

[d] IEC: Immune Evasion Cluster. Tipo A (*scn, chp, sak, sea*); Tipo B (*scn, chp, sak*); Tipo E (*scn, sak*); Tipo F (*scn, chp, sak, sep*)

[e] SCORAD: S, severo (≥ 40); M, moderado (entre 15-39); L, leve (< 15)

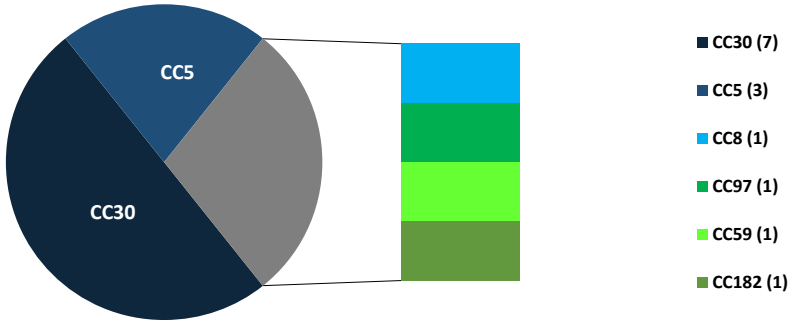


Figura 40. Distribución de las líneas genéticas mayoritarias entre los 14 aislados de *S. aureus* procedentes de frotis nasales de 14 pacientes pediátricos con DA.

La comparación de las cepas de ambos orígenes (cutáneo y nasal) de los pacientes pediátricos con DA, arroja algunas diferencias, y no sólo respecto a la estructura poblacional detectada sino también respecto a la resistencia a antimicrobianos. Los porcentajes de resistencia de las cepas de *S. aureus* aisladas de la piel de los pacientes son algo superiores en el caso de macrólidos (23,1% piel *versus* 14,3% nasal), y aminoglucósidos (15-20% piel *versus* 7,1% nasal). Asimismo, entre las cepas aisladas de frotis cutáneos aparecen resistencias moderadas a clindamicina (11,5%) y a mupirocina (19,2%) mientras que no se detectaron aislados con estos fenotipos de resistencia entre las cepas de frotis nasales. (**Figura 41**). Tan sólo en el caso de la penicilina y el ácido fusídico, los porcentajes de resistencia fueron superiores en las cepas de origen nasal que en las de origen cutáneo.

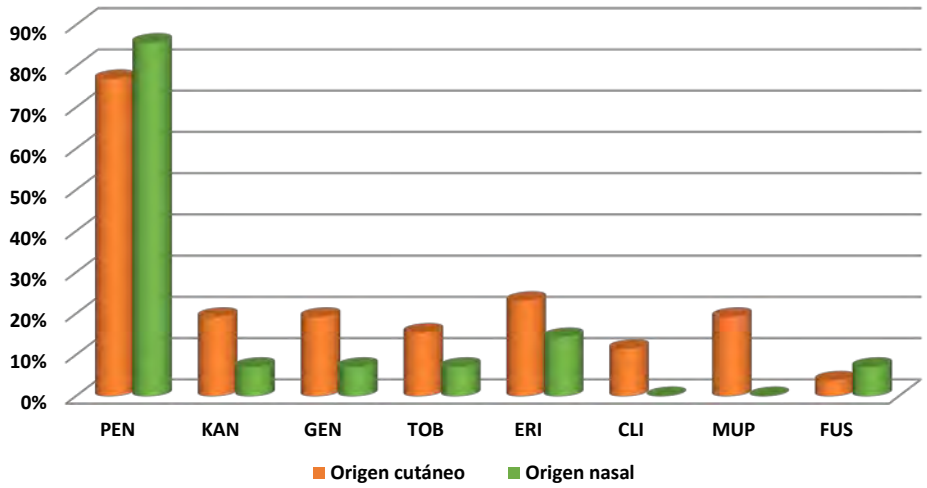


Figura 41. Comparativa de los porcentajes de resistencia entre las cepas de *S. aureus* de origen cutáneo y nasal de pacientes con DA

Es interesante remarcar que en cinco de los pacientes con DA (1, 2, 3, 4, y 6) se detectó *S. aureus* tanto en la muestra cutánea como en la nasal. Como se puede observar en la **Tabla 41**, los aislados de ambos origenes presentaron idénticas caracteristicas genéticas y correspondienron a los complejos clonales CC5 (pacientes 5 y 6) y CC30 (pacientes 1, 2 y 3).

Tabla 41. Características de los aislados de *S. aureus* de pacientes con DA en los que se detectaron *S. aureus* en muestras cutáneas y nasales de manera simultánea

Paciente	Origen	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de Virulencia		SCORAD[e]
		spa-type[a]	*agr*	MLST/CC[b]	Fenotipo[a,c]	Genotipo[a]	IEC[a,d]	Otros genes	
1	Nasal	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*tsst-1, hlA, hlG, luk-DE, aur, cna*	M
	Skin	t012	III	ST30/CC30	PEN, MUP	*blaZ*	A	*tsst-1, hlA, hlG, luk-DE, aur, cna*	M
2	Nasal	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	B	*tsst-1, hlA,hlB, hlG, aur, cna*	M
	Skin	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	B	*tsst-1, hlA, hlG, luk-DE, aur, cna*	M
3	Nasal	t021	III	ST30/CC30	PEN, FUS	*blaZ*	A	*tsst-1, hlA, hlG, aur, cna*	M
	Skin	t021	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*tsst-1, hlA, hlB, hlG, luk-DE, aur, cna*	M
5	Nasal	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msrA, mphC*	F	*hlA, hlGv, luk-DE, aur*	S
	Skin	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msrA, mphC*	F	*tsst-1, hlA, hlB. hlGv, luk-DE, aur*	S
6	Nasal	t777	II	ST5/CC5	ERY, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6´)-Ie-aph(2”), ant(4´)-Ia*	F	*hlA, hlGv, luk-DE, aur*	S
	Skin	t777	II	ST5/CC5	ERY, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6´)-Ie-aph(2”), ant(4´)-Ia*	F	*tsst-1, hlA, hlGv, luk-DE, aur*	S

[a] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

[b] Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas

[c] Antimicrobianos: PEN, penicilina; ERI, eritromicina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; MUP, mupirocina; FUS, ácido fusídico.

[d] IEC: Immune Evasion Cluster. Tipo A (*scn, chp, sak, sea*); Tipo B (*scn, chp, sak*); Tipo F (*scn, chp, sak, sep*)

[e] SCORAD: S, severo (≥ 40); M, moderado (entre 15-39); L, leve (< 15)

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CLÍNICOS SARM CC398 Y SU RELACIÓN CON EL CONTACTO CON ANIMALES DE GRANJA

2.1. Aislados SARM-TET^R de origen hospitalario de pacientes con/sin contacto con animales de granja

En estudios previos se habia visto que la mayor parte de las cepas SARM de la linea genética ST398 eran resistentes a la tetraciclina. Por ello, el siguiente objetivo que nos planteamos fue determinar la prevalencia de esta linea genetica ST398 entre los aislados clínicos SARM-TET^R obtenidos a nivel hospitalario y también determinar si esta línea genética estaba mas asociada con pacientes que habian tenido un contacto previo con animales de granja.

Durante los años 2011-2012, se recogieron 749 cepas SARM procedentes de diferentes pacientes en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza (Hospital UMS-Z), lo que representó un 22,5% del total de cepas de *S. aureus* obtenidas en ese período. Se seleccionaron para este estudio las 98 cepas que presentaron resistencia a tetraciclina, además de resistencia a meticilina (SARM-TET^R), y estas cepas representaron el 13,1% del total de SARM aislados durante el período. Las cepas SARM-TET^R fueron aisladas tanto de muestras de control epidemiológico (frotis nasales, 40 cepas, 40,8%), como de muestras con significación clínica (58 cepas, 59,2%). Las cepas con significación clínica fueron aisladas de muestras (número de cepas): a) infecciones de piel (35); b) respiratorias (15); c) urogenitales (7); y d) sangre (1). Asimismo, y de forma paralela, se llevó a cabo una encuesta epidemiológica en los pacientes portadores de estas cepas sobre el posible contacto con animales de granja de los mismos en los 18 meses previos a la toma de muestra y del aislamiento de la cepa SARM-TET^R. A través de los resultados de la encuesta, se establecieron 3 grupos de riesgo: A) 25 pacientes que refirieron contacto con animales de granja; B) 42 pacientes que no habían tenido contacto con animales de granja y C) 31 pacientes en los cuales no se pudo obtener información acerca de su contacto con animales de granja.

Entre las 98 cepas SARM-TET^R se detectaron 21 tipos *spa* diferentes, siendo predominantes los siguientes [tipo *spa* (nº de cepas)]: t011 (44), t127 (18), t1451 (7), t067 (6) y t1255 (4). Los 16 tipos *spa* restantes fueron detectados en una o dos de las cepas: t1197, t2220, t5229, t002, t024, t167, t216, t688, t701, t899, t1456, t1594, t1606, t1618, t1784 y t10664 (este último se describió por primera vez en este estudio y se incorporó a la base de datos de Ridom Spa Server). Se realizó el tipado por MLST para 25 cepas (incluyendo una cepa

por cada uno de los 21 tipos *spa* diferentes y 4 cepas adicionales con *spa* t011 o t127). Se detectaron 10 secuencias tipo diferentes: ST1, ST5, ST8, ST25, ST45, ST59, ST125, ST188, ST398 y ST627. Basándonos en el ST y/o en el tipo *spa* detectado, todas las cepas SARM-TET^R fueron adscritas a 9 complejos clonales diferentes [CC (nº de cepas/% de cepas)]: CC398 (59/60.2%), CC1 (19/19.4%), CC5(12/12.2%), y las 8 cepas restantes fueron adscritas a los complejos clonales CC6, CC8, CC25, CC45, CC59 y CC188, representando un 8,2% del total. El alotipo *agr* que se detectó con más frecuencia fue el *agr* I (67 cepas), seguido del *agr* III (20 cepas) y el *agr* II (12 cepas). Todas las cepas fueron tipadas en relacion al SCC*mec*, siendo el SCC*mec* V el más frecuente (66,3% de las cepas), seguido del SCC*mec* IV (32,6%). En una cepa t165-ST25/CC25, no se pudo tipar el casete cromosómico (**Tablas 42-44**).

Del total de las 98 cepas SARM-TET^R estudiadas, 59 de ellas correspondieron al clon CC398, representando un 60,2% del total de las cepas seleccionadas. Si consideramos las 749 cepas SARM recogidas en el Hospital UMS-Z durante el período estudiado, el clon CC398 representa al menos el 7,9% del total de cepas, pudiendo ser mayor, en el caso de que estuviese presente también dicho clon entre los aislados sensibles a meticilina (no considerados en este estudio).

Si analizamos los resultados por separado, tomando como referencia los distintos grados de contacto con animales de granja de los pacientes del estudio, encontramos diferencias significativas ($p<0.05$) entre las líneas genéticas más frecuentes del grupo de pacientes A, con contacto con animales de granja (CC398 representó el 76% del total) respecto del grupo de pacientes B, sin contacto con animales granja (CC398 representó el 50% del total). Aún más evidente es la hegemonía del clon CC398 si consideramos sólo aquellas cepas con significancia clínica del grupo A (75%), con respecto a las cepas homólogas del grupo B (46%). En relación a otros clones, se encontraron similares frecuencias de detección para el clon CC1 tanto en el grupo A (20%) como en el grupo B (21,4%). No fue así para el clón CC5 que se encontró de manera más frecuente entre las cepas del grupo B (14,3%) que entre las del grupo A (4%). Cabe mencionar que en el grupo C, donde no teníamos información epidemiológica respecto al contacto con animales de granja, el clon mayoritariamente encontrado fue el CC398 (61%). En la **figura 42** podemos ver de forma más clara la distribución de los CCs derivados del establecimiento de los 3 grupos de estudio en relación con el contacto con animales de granja definidos anteriormente.

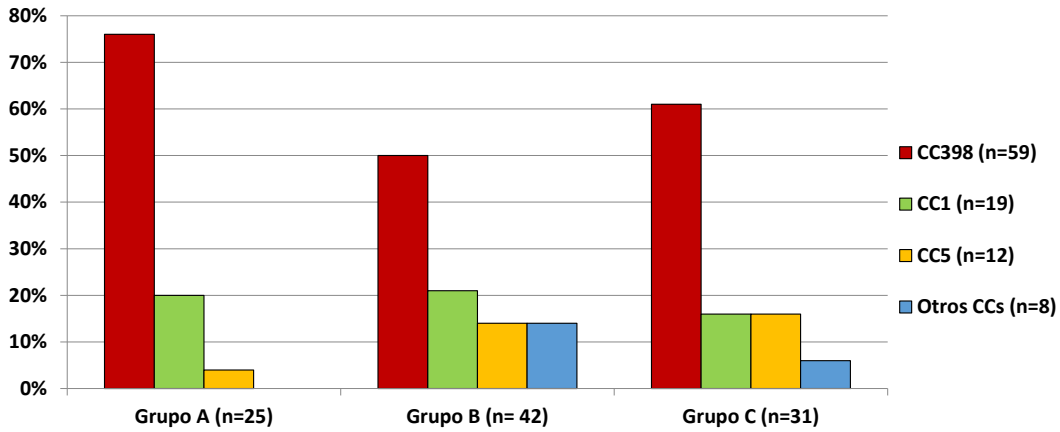


Figura 42. Porcentaje de cepas SARM-TET^{R} en función de las líneas genéticas detectadas en los 3 grupos estudiados: A) contacto con animales de granja; B) no contacto con animales de granja; y C) sin datos de contacto con animales de granja.

Por otro lado, considerando el origen de las cepas SARM-TET^{R} con respecto a los complejos clonales detectados, podemos observar como el clon CC398 se detecta principalmente en muestras de control epidemiológico (nasal y faríngeo), de muestras procedentes de infecciones de piel y partes blandas y de muestras procedentes de infecciones del tracto respiratorio. En el caso de las cepas adscritas a los complejos clonales CC1 y CC5, su detección se realizó fundamentalmente en cepas procedentes de muestras de infecciones de piel y partes blandas y en muestras de control epidemiológico (**Figura 43**).

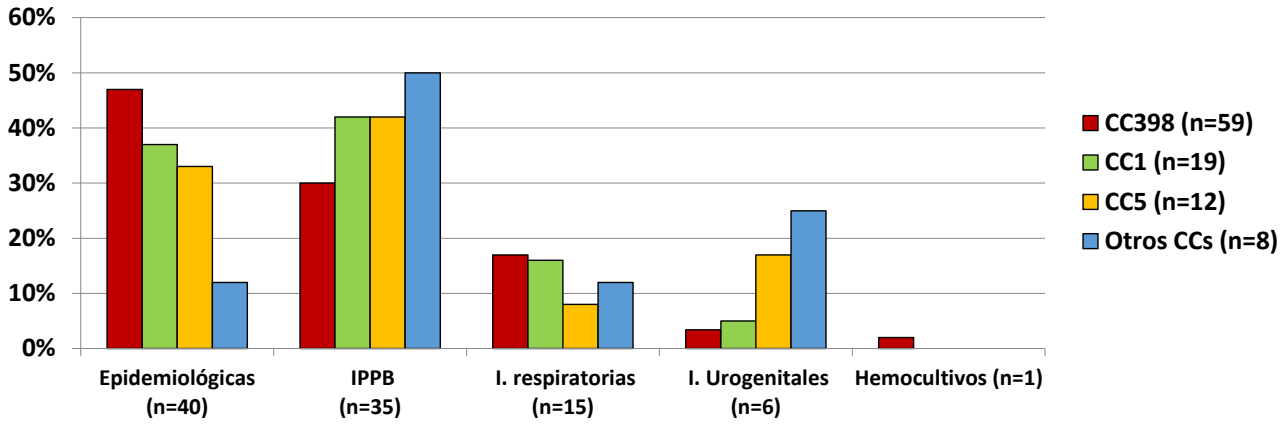


Figura 43. Porcentaje de cepas SARM-TET^{R} relacionadas con el tipo de muestras de las que fueron aisladas. IPPB, infecciones de piel y partes blandas. El porcentaje de cepas se muestra encima de las barras.

Tabla 42. Características de las 25 cepas SARM-TET^{R} procedentes de pacientes que referían contacto con animales de granja (Grupo A)

Nº cepas	I/E[a]	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
		MLST/CC[b]	*spa*-type[c]	*agr*/SCC*mec*	Fenotipo[c,d]	Genotipo[c]	IEC[e]	Otros genes[c]
12	7/5	ST398/CC398	t011	I/V	ERI^{8}, CLI^{8}, GEN^{2}, TOB^{3}, KAN^{3}, CIP^{8}	*tet(K)*^{10}, *tet(L)*^{2}, *tet(M)*, *msr(A)*^{1}, *msr(B)*^{1}, *mph(C)*^{1},*erm(A)*^{5}, *erm(B)*^{2}, *erm(C)*^{7}, *vga(A)*^{1}, *lnu(A)*^{3}, *ant(4´)-Ia*^{3}, *aph(3´)-IIIa*^{3}, *aac(6´)-Ie-aph(2")*^{2}	Negativo	*hlA*, *hlB*^{9}, *hlG*^{8}, *aur*^{9}, *cna*^{5}, *luk-DE*^{1}
3	0/3	ST398/CC398	t1255	I/V	ERI^{2}, CLI, GEN^{2}, TOB^{2}, KAN^{2}, CIP^{1}	*tet(K)*^{1}, *tet(L)*^{1}, *tet(M)*, *erm(B)*^{1}, *erm(C)*^{2}, *erm(T)*^{1},*vga(A)*^{2},*lnu(A)*, *ant(4´)-Ia*^{2},*aph(3´)-IIIa*^{2}, *aac(6´)-Ie-aph(2")*^{2}	Negativo	*hlA,hlB, hlG, aur, cna*^{2}
4	2/2	ST398/CC398	t1451^{3}, t1456^{1}	I/V	ERI^{2}, CLI^{2}, CIP	*tet(K)*^{2}, *tet(L)*^{2}, *tet(M)*, *erm(C)*^{2}, *vga(A)*^{2}	Negativo	*hlA*, *hlB*, *hlG*, *aur*, *cna*^{2}
5	3/2	ST1/CC1	t127	III/IV	ERI^{4}, CLI	*tet(M)*^{1}, *tet(K)*^{1}, *tet(L)*^{3}, *erm(A)*^{3}, *erm(C)*^{4}, *vga(A)*^{1}	E	*hlA*^{2}, *hlB*^{3}, *hlG*^{1},*hlGv*^{3}*aur*^{4}, *cna*^{3}, *luk-DE*^{4}
1	0/1	ST5/CC5	t2220	II/IV	ERI, CIP, SXT^{1}	*tet(K)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *mph(C)*	F	*hlA*, *hlB*, *hlGv*, *aur*, *luk-DE*

[a] I: cepas procedentes de muestras con significación clínica; E: cepas procentes de muestras nasales o faríngeas (de control epidemiológico)
[b] Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas
[c] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada
[d] Antimicrobianos: ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacino; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazol.
[e] IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo E (*scn, sak*) y IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep*).

Tabla 43. -Características de las 42 cepas SARM-TET^{R} procedentes de pacientes que referían NO haber tenido contacto con animales de granja (Grupo B)

Nº cepas	I/E[a]	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de Virulencia	
		MLST/CC[b]	*spa*-type	*agr*/SCC*mec*	Fenotipo[c,d]	Genotipo[c]	IEC[c,e]	Otros genes[c]
18	10/8	ST398/CC398	t011	I/V	ERI[9], CLI[9], CIP[11]	*tet(K)*[11], *tet(L)*[9], *tet(M)*[17], *msr(A)*[2], *msr(B)*[1],*mph(C)*[1], *erm(B)*[2], *erm(C)*[5], *vga(A)*[5]	Negativo	*hlA*[11], *hlB*[10], *hlG*[12], *aur*[13], *cna*[12], *luk-DE*[1]
2	2/0	ST398/CC398	t1451	I/V	ERI, CLI, CIP	*tet(K)*[1], *tet(M)*, *erm(C)*[2], *vga(A)*[1], *lnu(A)*[1]	Negativo	*hlA, hlB, hlG, aur, can, luk-DE*[1]
1	1/0	ST398/CC398	t1197	I/V	PEN	*tet(K), tet(L)*	Negativo	*aur, cna*
9*	5/4	ST1/CC1	t127[8], t1784[1]	III/IV	ERI, CLI[7], CIP[1]	*tet(K)*[6], *tet(L)*[3],*tet(M)*[1], *msr(A)*[2], *msr(B)*[2], *mph(C)*[2], *erm(C)*[6]	E	*hlA*[7], *hlB*[8], *hlgv*[8], *aur*[8], *cna*[8], *luk-DE*[6]
5*	4/1	ST125/CC5	t067	II/IV	ERI[5], CLI[4], GEN[1], TOB[2], KAN[2], CIP[4]	*tet(K), msr(A)*[4], *msr(B)*[4], *mph(C)*[4], *erm(B)*[3], *erm(C)*[2], *ant(4´)-Ia*[2], *aph(3´)-IIIa*[2], *aac(6´)-Ie-aph(2")*[1]	F[4] or G[1]	*hlA*[4], *hlB*[23], *hlGv, aur*[5],*luk-DE*[5]
1	1/0	ST5/CC5	t002	II/IV	CLI, CIP	*tet(K), lnu(A)*	F	*hlA, hlB, hlG, aur, luk-DE*
1	0/1	ST8/CC8	t024	III/V	ERI, CLI	*tet(K), erm(B), erm(C)*	E	*hlA, hlB, hlGv, aur, cna, luk-DE*
1	1/0	ST8/CC8	t10664	I/IV	CLI, CIP, SXT	*tet(K), dfr(S1)*	D	*hlA, hlB, hlGv, aur, luk-DE*
1	1/0	ST25/CC25	t167	I/NT	ERI, GEN, TOB, KAN, CIP	*ant(4´)-Ia, aph(3´)-IIIa, aac(6´)-Ie-aph(2")*	B	*hlA, hlB, hlGv, aur, luk-DE*
1	1/0	ST6/CC6	t701	I/V	CIP	*tet(M)*	Negativo	*hlA, hlB, hlGv, aur, cna, luk-DE*
1	1/0	ST59/CC59	t216	I/IV	Negativo	*tet(K)*	Negativo	*hlA, hlB, hlGv*
1	1/0	ST45/CC45	t1618	I/V	ERI	*tet(M), msr(A), mph(C),*	Negativo	*aur, cna*

*Una cepa de este grupo fue aislada de un paciente que tenia contacto con mascotas

[a] I: cepas procedentes de muestras con significación clínica; E: cepas procentes de muestras nasales o faríngeas(de control epidemiológico)

[b]Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas. NT, no tipable.

[c] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

[d]Antimicrobianos: ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacino; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazol.

[e]IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo B (*scn, chp,* sak); IEC tipo D (*scn, sak,* sea); IEC tipo E (*scn, sak*), IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep)* e IEC tipo G (*scn, sak, sep*)

Tabla 44. -Características de las 31 cepas SARM-TET^{R} procedentes de los pacientes sin información sobre su contacto con animales de granja (Grupo C)

Nº cepas	I/E[a]	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
		MLST/CC[b]	*spa*-type	*agr*/SCC*mec*	Phenotype[c, d]	Genotype[c]	IEC[e]	Otros genes[c]
14	6/8	ST398/CC398	t011	I/V	ERI[9], CLI[11], CIP[2], MUP[1], FUS[1]	*tet(K)*[10], *tet(L)*[10], *tet(M)*[11], *erm(C)*[9], *vga(A)*[3], *lnu(A)*[1], *fus(C)*[1], *mup(A)*[1]	Negativo	*hlA*[12], *hlB*[10], *hlG*[11], *aur*[11], *cna*[13]
1	0/1	ST398/CC398	t1255	I/V	ERI, CLI, CIP	*tet(K), tet(M), erm(C), lnu(A), erm(B)*	Negativo	*hlA, hlB, hlG, aur, cna, luk-DE*
1	1/0	ST398/CC398	t899	I/IV	Negativo	*tet(K), tet(L), tet(M)*	Negativo	*aur, cna, hlA, hlB, hlgv,*
3	2/1	ST398/CC398	t1451/t1606/ t1197	I/V	ERI[1], CLI[1], CIP[1]	*tet(K), tet(M), erm(C)*[1]	Negativo	*hlA, hlB, hlGv, aur*[1], *cna*[1]
5	4/1	ST1/CC1	t127	III/IV	ERI, CLI, TOB[1], KAN[1]	*tet(K)*[4] , *tet(L)*[2], *tet(M)*[1], *msr(A)*[1], *msr(B)*[1], *mph(C)*[1], *erm(A)*[1], *erm(C)*[4], *vga(A)*[1], *ant(4´)-Ia*[1], *aph(3´)-IIIa*[1],	E	*hlA*, *hlB*[3], *hlgv*[4], *aur*, *cna*[3], *luk-DE*[4]
2	2/0	ST125/CC5	t067	II/IV	ERI[1], CLI[1], TOB[1], KAN, CIP[1]	*tet(K)*[1], *tet(L)*[1], *tet(M)*[1], *msr(A)*[1], *msr(B)*[1], *mph(C)*[1],*erm(B)*[1], *erm(C)*[1], *ant(4´)-Ia*[1], *aph(3´)-IIIa*	F	*hlA*, *Luk-DE*, *hlB*[1], *hlgv*[1], *aur*[1], *cna*[1]
1	0/1	ST5/CC5	t688	II/V	Negative	*tet(M)*	G	*hlA, hlB, hlGv, aur, luk-DE*
1	0/1	ST5/CC5	t2220	II/V	CIP, GEN, TOB, KAN, MUP	*tet(K), aac(6´)-Ie-aph(2”), mup(A)*	F	*hlA, hlGv, aur, luk-DE*
1	1/0	ST627/CC5	t1594	II/IV	GEN, TOB, KAN	*aac(6´)-Ie-aph(2”), aph(3´)-IIIa*	F	*hlA, aur, luk-DE*
2	2/0	ST188/CC188	t5229	I/V	CLI, CIP[1]	*tet(K), tet(L), vga(A)*	F	*hlA*,*hlB, hlGv*[1], *aur, cna, luk-DE*[1]

[a] I: cepas procedentes de muestras con significación clínica; E: cepas procentes de muestras nasales o faríngeas (de control epidemiológico)
[b] Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas. NT, no tipable.
[c] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada
[d] Antimicrobianos: ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; CIP, ciprofloxacino; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazol.
[e] IEC: Immune Evasion Cluster. IECtipo E (*scn, sak*), IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep)* e IEC tipo G (*scn, sak, sep*).

Respecto a la resistencia a antimicrobianos, se encontraron diferencias en fenotipos y genotipos de resistencia en relación con los complejos clonales mayoritarios (CC398, CC1 y CC5) **(Figura 44).**

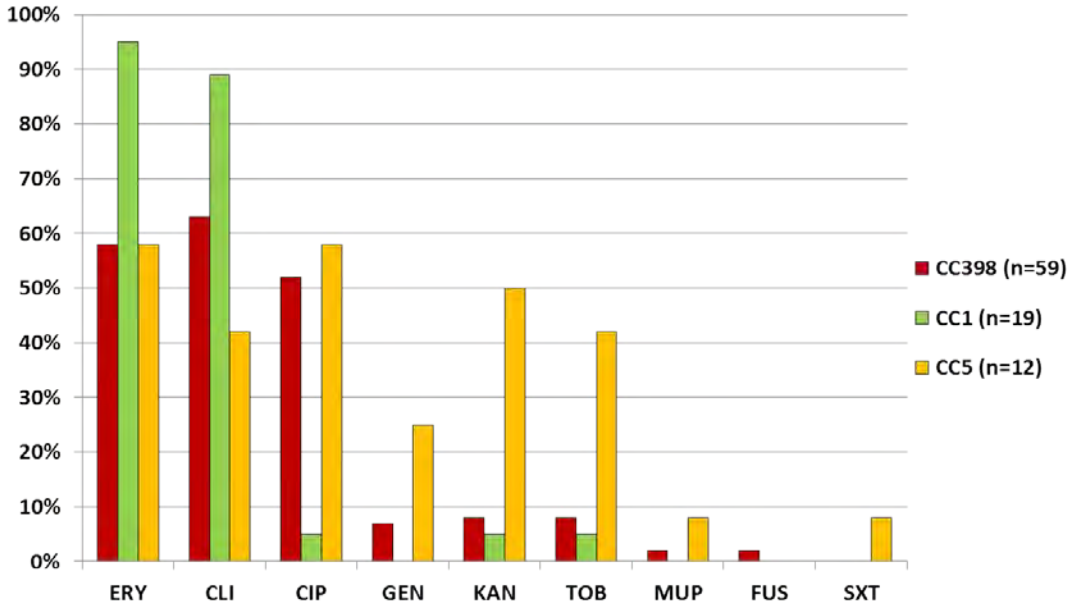


Figura 44. Porcentaje de cepas SARM-TET^{R} resistentes a antimicrobianos en relación con los complejos clonales predominantes (CC398, CC1, CC5). ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; MUP, mupirocina; TET, tetraciclina; FUS, ácido fusidico; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

Más de la mitad de las cepas adscritas al complejo clonal CC398 presentaron resistencia a eritromicina (58%), clindamicina (63%) y ciprofloxacino (52%), y presentaron porcentajes de resistencia mucho menores para aminoglucósidos (7-8%), mupirocina (2%) y ácido fusídico (2%). Por otra parte, las cepas pertenecientes al complejo CC1 presentaron altas tasas de resistencia a eritromicina (95%) y clindamicina (89%), pero valores mucho más bajos, del orden del 5%, para antibióticos como ciprofloxacino, kanamicina y tobramicina. Por el contrario, la mayoría de cepas adscritas al complejo CC5 presentaron fenotipos de multirresistencia, destacando los valores a eritromicina (58%), ciprofloxacino (58%) y clindamicina (42%). Tampoco fueron despreciables las tasas de resistencia a aminoglucósidos en CC5, con rangos comprendidos entre el 25-50%; además, una de estas cepas resultó ser resistente a mupirocina y otra a trimetoprim-sulfametoxazol

En lo que respecta al genotipo de resistencia, también se encontraron diferencias destacables entre los distintos complejos clonales mayoritarios. Así, especialmente prevalente fue el gen *tet*(M) en las cepas CC398, que confiere resistencia a tetraciclina. Los genes *lnu*(A) y *vga*(A), asociados con la resistencia a lincosaminas, fue relativamente frecuente entre las cepas CC398 (15% y 24%, respectivamente). Es destacable que, en general, la mayoría de

genes de resistencia detectados fueron encontrados en alguna cepa perteneciente al complejo CC398, incluso los genes *mup*(A) y *fus*(C). Entre las cepas adscritas al complejo CC1, destaca la alta prevalencia del gen *erm*(C), presente en el 74% de estas cepas y que le confiere resistencia a macrólidos y lincosaminas. Por otro lado, los genes que confieren resistencia a macrólidos, como *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), así como los genes codificantes de resistencia a aminoglucósidos, *ant*(4´)-Ia, *aph*(3´)-IIIa y *aac*(6´)-Ie-*aph*(2”), estan altamente representados (25-50%) entre las cepas pertenecientes al CC5. La resistencia a tetraciclina está mediada en los aislados del complejo CC5 fundamentalmente por el gen *tet*(K) (**Figura 45**).

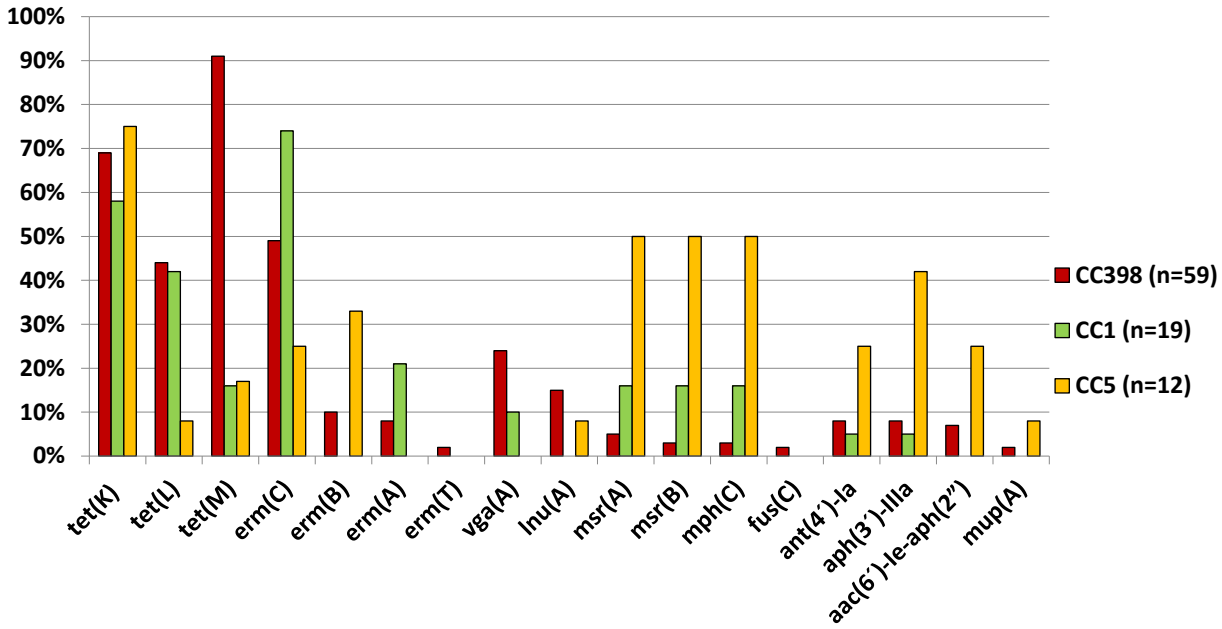


Figura 45. Genes de resistencia a antibióticos detectados en las cepas SARM-TET^{R} en relación con los complejos clonales mayoritariamente detectados (CC398, CC1, CC5)

Respecto a los perfiles de virulencia, no se han detectado cepas que porten los genes de virulencia *pvl*, *tsst-1,* ni ningún gen codificante de exfoliatinas. La mayoría de cepas contenían una combinación variable de hemolisinas, siendo la alfa, gamma y variante gamma las más frecuentes; no obstante, el gen de la gamma (*hlG*) fue el más prevalente entre las cepas adscritas al CC398 y el de la variante gamma (*hlGv*) entre las demás cepas de otros complejos clonales. Se observó una alta prevalencia del gen de la proteína de adhesión al colágeno (*cna*) en las cepas pertenencientes a los clones CC1 (73,7%) y CC398 (67,8%).

2.2. Casos clínicos SARM/SASM-TET^R CC398 seleccionados de pacientes con contacto ganadero de diversa duración

Se estudiaron cuatro casos clínicos procedentes de personas con contacto (presente o en el pasado) con granjas de explotación ganaderas o con cerdos, con diferentes grados de exposición o tiempos de inactividad en relacion a la granja, con el fin de conocer el grado de colonización remanente por CC398 tras cierto tiempo sin contacto animal en su vida profesional. Para ello se seleccionaron pacientes que a su ingreso hospitalario presentaban cepas de *S. aureus* en lesiones o en muestras de control epidemiológico (generalmente muestras nasales) y las cepas presentaban el rasgo común de resistencia a tetraciclina (TET^R). La selección y el aislamiento de las cepas, así como la obtención de los datos epidemiológicos se llevaron a cabo en el Hospital RV-Z. La caracterización molecular de las cepas se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de La Rioja.

Caso Clínico 1

Paciente de 57 años que trabajó en el pasado en una granja de cerdos y en la actualidad ayudaba a su hijo en dicha granja. Al tiempo de la admisión hospitalaria, se le realizó un frotis nasal como control epidemiológico en el que se aisló una cepa SASM perteneciente a la línea genética CC398. En vista del aislamiento de la línea genética CC398, se procedió a la realización de un estudio epidemiológico entre los miembros de su familia más allegada, encontrándose un total de 7 aislados de *S. aureus* en 4 de sus familiares (mujer, hijo, hermana y nieto). Asimismo se llevó a cabo un estudio sobre los cerdos de la granja y tras la toma de muestras nasales de 13 cerdos, se obtuvieron cepas *S. aureus* en seis de los cerdos obteniéndose una cepa de cada uno de ellos. En la **Tabla 45** se presentan las características de todas las cepas.

Cepas procedentes de personas

Tras el tipado molecular de los 7 aislados *S. aureus* del paciente y sus familiares, se encontraron 4 tipos *spa*- diferentes (nº de cepas): t011 (1), t019 (2), t899 (1) y t1451 (3), pertenecientes a 2 secuencias tipo: ST30 (t019) y ST398 (t011, t899 y t1451), adscritas a los complejos CC30 y CC398, respectivamente. Las cepas CC30 presentaban el *agr* III, mientras que las cepas CC398 tenían el *agr* I. De las 7 cepas, 4 de ellas resultaron ser SARM, todas ellas pertenecientes al complejo CC398, mientras que las otras 3 eran SASM, siendo una de ellas CC398 y las otras dos CC30. Entre las SARM se detectaron 2 tipos de SCC*mec*, el SCC*mec* V

(entre las cepas t011 y t1451-ST398/CC398) y SCC*mec* IV (en el caso de la cepa tipada como t899-ST398/CC398) (**Tabla 45**).

En el caso índice, la cepa encontrada resultó ser un SASM t011-ST398/CC398. Las 2 cepas t019-ST30/CC30 que eran SASM fueron detectadas en frotis nasales del hijo y del nieto. Las 3 cepas CC398 con tipo *spa* t1451 resultaron ser SARM y fueron detectadas en la mujer y la hermana del caso indice. Finalmente la cepa tipada como t899-ST398/CC398 resultó ser SARM y fue detectada en el nieto del caso indice.

El análisis de los fenotipos de resistencia aportaron datos interesantes. Así se determinó que todas las cepas SARM y SASM CC398 presentaban un fenotipo de multirresistencia similar, pero con algunas diferencias. Destaca la cepa SASM-t011-ST398/CC398 con un perfil de resistencia algo diferente [genes detectados]: clindamicina [*lnu*(A), *vga*(A)], gentamicina, kanamicina y tobramicina [*aac*(6´)-Ie-*aph*(2"), *ant*(4´)-Ia], estreptomicina [no se detectaron genes asociados], y tetraciclina [*tet*(L), *tet*(M)]. Como podemos observar, esta cepa poseía un fenotipo de resistencia disociado a macrólidos y lincosaminas. En lo que respecta al resto de cepas CC398, que eran SARM [portaban el gen *mec*(A)], presentaban un fenotipo de resistencia no-disociado macrolidos-lincosaminas asociado al gen *erm*(C), apoyado por la presencia del gen *vga*(A) para la clindamicina. Algunas cepas poseían el gen *ant*(4´)-Ia de resistencia a tobramicina, pero ninguna presentaba determinantes de resistencia para el resto de aminoglucósidos, a diferencia de la cepa SASM-CC398. En general, todas las cepas presentaron los genes de resistencia a tetraciclina [*tet*(K), *tet*(L), *tet*(M)], a excepción de la cepa SARM t899-ST398/CC398 y la cepa SASM t011-ST398/CC398 que carecían de *tet*(K). Una cepa SARM tipada como t1451-ST398/CC398 presentaba a su vez un determinante genético de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, *dfr*(A). En cuanto a las cepas SASM t019-ST30/CC30, tan sólo poseían resistencia a eritromicina y clindamicina mediada por el gen *erm*(C).

Por lo que respecta al perfil de virulencia, las 7 cepas poseían el gen *cna* (codificante de la proteína de unión al colágeno), tan sólo las adscritas al CC30 presentaban el gen *tsst-1* (codificante de la toxina del shock tóxico) y sólo en el caso de las CC398 se detectó el gen *vwb* (factor de von Willebrand).

Cepas procedentes de cerdos

Las cepas procedentes de cerdos se recogieron en la explotación porcina en la que trabajaba de forma activa el hijo del caso índice. Se testaron 13 cerdos mediante hisopado nasal. Las 6 cepas porcinas resultaron ser SARM [portando el *mec*(A)], encontrándose 2 cepas

t011-ST398, 2 cepas t1451-ST398/CC398 siendo las 4 *agr* I y SCC*mec* V y otras 2 cepas t899-ST398/CC398, con *agr* I y SCC*mec* IV. En cuanto al perfil de resistencia resultaron ser fenotípicamente muy parecidas, siendo las t011 resistentes a ciprofloxacino, eritromicina y clindamicina [*erm*(C), *vga*(A)], además de a tetraciclina [*tet*(K), *tet*(M)]. En el caso de las cepas con tipo *spa*-t899 resultaron tener el mismo fenotipo y genotipo que las anteriores pero con resistencia a tobramicina [*ant*(4´)-Ia] y careciendo de uno de los determinantes de resistencia a tetraciclina, el *tet*(K). Las cepas con tipo *spa* t1451, presentaron el mismo perfil de resistencia que las anteriores pero con el gen *erm*(B) (adicional para macrólidos y lincosaminas), el gen *dfr*(A), de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y en éste caso si que portaban los 3 genes de resistencia a tetraciclina, *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M) (**Tabla 45**). En cuanto al perfil de virulencia, todas ellas presentaron los genes *cna*.

Estudio de clonalidad

Se realizó un estudio comparativo de las cepas de este caso clínico mediante PFGE con la enzima *cfr9-I* para comparar los diferentes patrones electroforéticos con el fin de determinar si las cepas presentes entre los aislados de personas eran las mismas que las procedentes de cerdos. Los resultados los podemos ver en la **figura 46**.

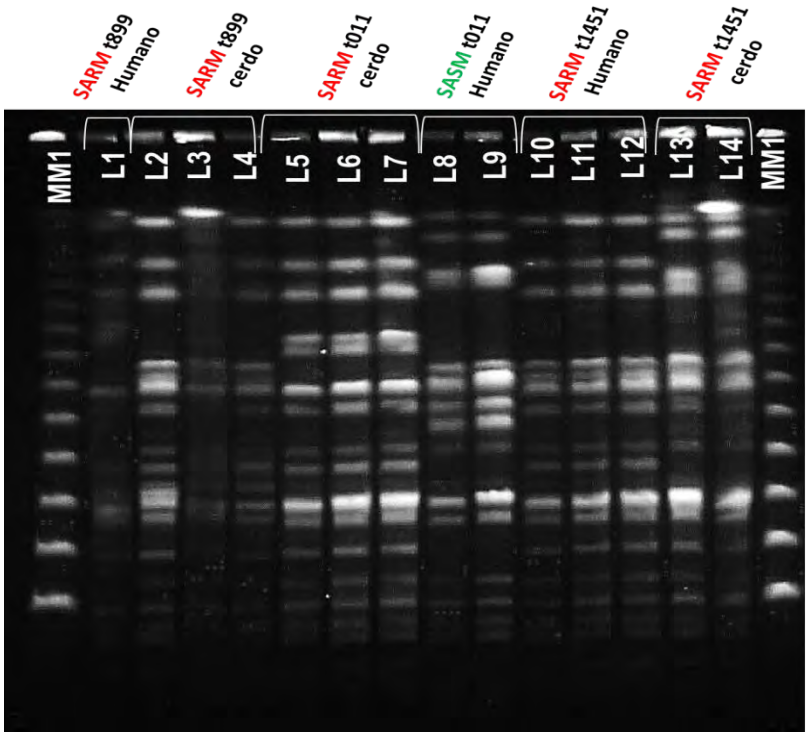


Figura 46. Resultado PFGE de las cepas del caso clínico 1 digeridas con la enzima *cfr9-I*

Tabla 45. Características de las 13 cepas SASM/SARM estudiadas depersonas y de cerdos de la granja procedentes del caso clínico 1

Cepa	Origen	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
	SASM/SARM	MLST/CC[a]	*spa*-type	*agr*/SCC*mec*	Fenotipo[b]	Genotipo	IEC[c]	Otros genes
CEPAS PROCEDENTES DE PERSONAS								
C6411	Caso guía SASM	ST398/CC398	t011	I/-	CLI, KAN, GEN, STR, TET, TOB	*lnu(A), vga(A), aac(6´)-Ie-aph(2”), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia*	Negativo	*cna, vwb*
C6543	Mujer SARM	ST398/CC398	t1451	I/V	OXA, CIP, ERI, CLI, TET	*mec(A), erm(C),vga(A), tet(K), tet(L), tet(M)*	Negativo	*cna, vwb*
C6544	Mujer SARM	ST398/CC398	t1451	I/V	OXA, CIP, ERI, CLI, TET, TOB	*mec(A), erm(C),vga(A), tet(K), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia*	Negativo	*cna, vwb*
C6546	Hermana SARM	ST398/CC398	t1451	I/V	OXA, CIP, ERI, CLI, TET, TOB, SXT	*mec(A), erm(C),vga(A), tet(K), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia, dfr(A)*	Negativo	*cna, vwb*
C6542	Nieto SARM	ST398/CC398	t899	I/IV	OXA, CIP, ERI, CLI, TET, TOB	*mec(A), erm(C), vga(A), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia*	Negativo	*cna, vwb*
C6541	Nieto SASM	ST30/CC30	t019	III/-	ERI, CLI	*erm(C)*	D	*cna*
C6554	Hijo SASM	ST30/CC30	t019	III/-	ERI, CLI	*erm(C)*	D	*cna*
CEPAS PROCEDENTES DE CERDOS								
C6547	Cerdo 3 SARM	ST398/CC398	t011	I/V	OXA, CIP, ERY, CLI, TET	*mec(A), erm(C), vga(A), tet(K), tet(M)*	Negstivo	*cna. vwb*
C6548	Cerdo 6 SARM	ST398/CC398	t011	I/V	OXA, CIP, ERY, CLI, TET	*mec(A), erm(C), vga(A), tet(K), tet(M)*	Negstivo	*cna. vwb*
C6550	Cerdo 10 SARM	ST398/CC398	t899	I/IV	OXA, CIP, ERY, CLI, TET, TOB	*mec(A), erm(C), vga(A), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia*	Negativo	*cna. vwb*
C6552	Cerdo 13 SARM	ST398/CC398	t899	I/IV	OXA, CIP, ERY, CLI, TET, TOB	*mec(A), erm(C), vga(A), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia*	Negativo	*cna. vwb*
C6585	Cerdo 1 SARM	ST398/CC398	t1451	I/V	OXA, CIP, ERY, CLI, TET, TOB, SXT	*mec(A), erm(B), erm(C), vga(A), tet(K), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia, dfr(A)*	Negativo	*cna, vwb*
C6586	Cerdo 11 SARM	ST398/CC398	t1451	I/V	OXA, CIP, ERY, CLI, TET, TOB, SXT	*mec(A), erm(B), erm(C), vga(A), tet(K), tet(L), tet(M), ant(4´)-Ia, dfr(A)*	Negativo	*cna, vwb*

[a]Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comunes de las cepas

[b]Antimicrobianos: OXA, oxacilina; CIP, ciprofloxacino; ERY, erithromicina; CLI, clindamicina; KAN, kanamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; STR, streptomicina; TET, tetraciclina; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazol.

[c]IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo D (scn, sak, sea)

Se obtuvieron 5 patrones PFGE diferentes (**tabla 46**) entre los que se observó que los patrones de las cepas adscritas a las líneas SARM t899-ST398/CC398 y t1451-ST398/CC398, tanto procedentes de humanos como de animales, estaban relacionadas clonalmente. Por otro lado, se observaron diferencias en el patrón de la línea SASM t011-ST398/CC398 procedente de humanos y los patrones de la línea SARM t011-ST398/CC398 procedente de cerdos.

Tabla 46. Comparativa de los resultados de PFGE tras la digestión con *cfr9-I* de las 11 cepas adscritas al complejo CC398 de origen humano y animal pertenecientes al caso clínico 1.

Lineas PFGE	Tipo	Cepas	Origen	spa-type	Patrón PFGE
L1	SARM	C6542	Humano	t899	B
L3	SARM	C6550	Cerdo	t899	B1
L2, L4	SARM	C6550, C6552(bis)	Cerdo	t899	A, A1
L5, L6, L7	SARM	C6547, C6548 (bis)	Cerdo	t011	C
L8, L9	SASM	C6411 (bis)	Humano	t011	D
L10, L11, L12	SARM	C6543, C6544, C6546	Humano	t1451	E
L13, L14	SARM	C6585, C6586	Cerdo	t1451	E1

Caso Clínico 2

Se aislaron 2 cepas de *S. aureus* procedentes de la misma muestra nasal de un paciente varón cuya actividad profesional estaba relacionada con el transporte de ganado porcino (camionero) y que habia sido ingresado en la UCI del hospital por una causa cardiológica y no infecciosa. Las 2 cepas pertenecían a la línea genética t011-ST398/CC398, pero diferían fundamentalmente en la resistencia meticilina, siendo una de ellas SARM (portando el gen *mec*(A) y SCC*mec* V) y la otra SASM. En ambos casos el alotipo *agr* encontrado fue el *agr* I. Ambas cepas presentaron un fenotipo de resistencia idéntico, con la excepción de la meticilina (testada con oxacilina y cefoxitina), detectándose resistencia a los siguientes antimicrobianos [genes detectados]: clindamicina [*lnu*(B)] y aminoglucósidos [*aac*(6´)-Ie-*aph*(2”), *ant*(4´)-Ia]. En relación a la resistencia a tetraciclina, ambas cepas albergaban los genes *tet*(M) y *tet*(L), pero en el caso de la cepa SASM carecía del gen *tet*(K), mientras que en la cepa SARM si fue detectado. El perfil de virulencia de ambas cepas fue idéntico, detectándose los genes *cna* y *vwb* (**Tabla 47**).

Caso Clínico 3

Se aisló una cepa SARM procedente de un antiguo granjero de 77 años que refería haber trabajado en una explotación bovina hacía más de 20 años. La cepa en cuestión fue tipada como sensible a meticilina, SASM t011-ST398/CC398 con *agr* I. El fenotipo y genotipo de resistencia detectado fue más discreto que en cepas homólogas de los casos clínicos anteriores, encontrándose tan sólo resistencia a aminoglucósidos con la detección de los genes

aac(6´)-Ie-*aph*(2”), y *ant*(4´)-Ia. Aunque la cepa también era resistente a tetraciclina, tan sólo se detectó el gen *tet*(M). En cuanto a su virulencia unicamente se detectaron los genes *cna* (**Tabla 47**).

Caso Clínico 4

Se aisló una cepa SARM procedente de un antiguo granjero de 84 años que indicó haber trabajado hacía mas de 20 años en una explotación de pollos y vacas. La cepa fue tipada como SARM t011-ST398/CC398 con *agr* I y SCC*mec* V. En este caso el fenotipo y genotipo de resistencia fue más amplio que en casos anteriores, detectándose resistencia a [genes detectados]: oxacilina y cefoxitina [*mec*(A)], eritromicina y clindamicina [*erm*(C), *lnu*(B)], aminoglucósidos [*aac*(6´)-Ie-*aph*(2”), *ant*(4´)-Ia], estreptomicina y ciprofloxacino [sin detección de genes asociados] y tetraciclina [*tet*(K), *tet*(M)]. En el perfil de virulencia se encontraron los genes *cna* y *vwb*. Una de las peculiaridades de ésta cepa es que presentó IEC tipo A, no habiéndose detectado IEC en ninguna de las cepas de los casos anteriores (**Tabla 47**).

Tabla 47. Características de las cepas de *S. aureus* procedentes de los casos clínicos 2, 3 y 4.

Cepa (caso clinico)	Origen	SASM/ SARM	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
			spa-type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC	Fenotipo[a]	Genotipo	IEC [c]	Otros genes
C6829 (2)	Camionero FN	SASM	t011	I	--	ST398/CC398	CLI, KAN, GEN, TOB, TET	*lnu(B), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia, tet(L), tet(M)*	--	*cna, vwb*
C6828 (2)	Camionero FN	SARM	t011	I	V	ST398/CC398	OXA, FOX, CLI, KAN, GEN, TOB, TET	*mec(A), lnu(B), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia, tet(K), tet(L), tet(M)*	--	*cna, vwb*
C7241 (3)	Exgranjero Orina	SASM	t011	I	--	ST398/CC398	KAN, TOB, GEN, TET	*tet(M), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia,*	--	*cna, vwb*
C7243 (4)	Exgranjero FN	SARM	t011	I	V	ST398/CC398	OXA, FOX, ERI, CLI, CIP, KAN, TOB, GEN, STR, TET	*mec(A), lnu(B), erm(C), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia, tet(K), tet(M)*	A	*cna, vwb*

[a]Antimicrobianos: OXA,oxacilina; FOX, cefoxitina; CIP, ciprofloxacino; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; KAN, kanamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; STR, streptomicina; TET, tetraciclina

[c]IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo A (*scn, chp, sak, sea*)

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *S. aureus* PROCEDENTES DE INDIVIDUOS SANOS

3.1. Prevalencia y caracterización molecular de aislados de *S. aureus* procedentes de muestras fecales de individuos sanos

Una vez analizadas las características genéticas de las cepas clínicas de *S. aureus* y de SARM obtenidas en diferentes situaciones epidemiológicas, el siguiente objetivo fue conocer el grado de colonización fecal por *S. aureus* de individuos sanos, determinando las caracteristicas genéticas de las cepas aisladas.

De un total de 100 personas analizadas, en las que el criterio de selección consistió en no haber tenido contacto hospitalario ni haber consumido antibióticos, al menos, en los 3 meses anteriores a la toma de muestras, se obtuvo *S. aureus* en las muestras fecales de 15 de dichos individuos (15%). En general ninguno de los individuos muestreados presentaban evidencia de contacto animal prolongado, excepto para uno de los voluntarios que refería contacto intermitente con una explotación ganadera.

Todas las cepas fueron sensibles a meticilina (SASM). Se detectó una gran variabilidad genética ya que entre ellas se identificaron 11 tipos *spa* diferentes, que mediante análisis por MLST se asociaron a 8 secuencias tipo distintas, adscritas a 7 complejos clonales [*spa*-type-ST/CC (nº de cepas)]: t012 y t021-ST30/CC30 (2), t136 o t166-ST34/CC30 (3), t084-ST15/CC15 (2), t216-ST59/CC59 (2), t002-ST5/CC5 (2), t209-ST109/CC9 (1), t3495-ST133/CC133 (1) y t571-ST398/CC398 (1). En una de las cepas se detectó un nuevo tipo *spa*, t7866 (añadido a la base de datos de Ridom Spa type), que fue asociado al linaje ST34/CC30. La cepa adscrita al CC133 se detectó en el voluntario que refirió contacto intermitente con animales, especialmente ungulados (ganado ovino y bovino). El 40% de las cepas pertenecieron al clon CC30, destacando también la detección de las cepas adscritas a los complejos clonales CC5, CC133 y CC398 (**Figura 47; Tabla 48**).El *agr* mayoritariamente detectado fue el *agr* III (6 cepas), seguido del *agr* II (5 cepas) y del *agr* I (4 cepas). Todas las cepas carecían de la habilidad de coagular el plasma bovino excepto la cepa tipada como t3495-ST133/CC133.

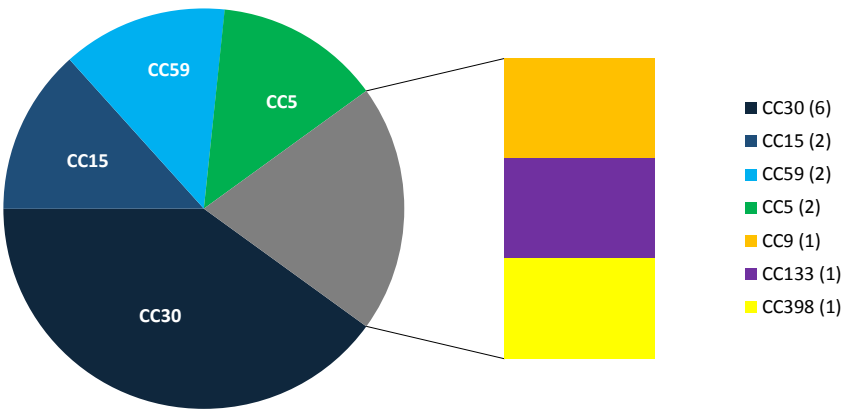


Figura 47. Distribución de los complejos clonales predominantes entre las 15 cepas SASM aisladas de muestras fecales de individuos sanos

Tabla 48. Caracterización molecular de las 15 cepas *S. aureus* procedentes de muestras fecales de individuos sanos.

Cepa	Tipado Molecular			Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia		
	***spa*-type**	***agr***	**MLST/CC**[a]	**Fenotipo**	**Genotipo**	**IEC** [c]	**Enterotoxinas (SEs)**	**Otros genes**
C3965	t571	I	ST398/CC398	ERI, CLI	*erm*(T)	C	*sed, sen*	*hla, hld, hlgv, aur*
C3968	t3495	I	ST133/CC133	Negativo	Negativo	Negativo	*sec, sej, sel, sen*	*tsst-1, hla, hlb, hld, hlgv, luk-DE, luk-M*
C3972	t216	I	ST59/CC59	Negativo	Negativo	B	*sej, sen*	*tsst-1, hla, hlb, hld, hlgv, aur*
C3973	t216	I	ST59/CC59	PEN	*blaZ*	C	*seb, sej, sek, sen, seq*	*hla, hlb, hld, hlgv, aur*
C3969	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*sea, sej, [seg, sei, , sem, sen, seo, seu]*[d]	*hla, hlb, hld, hlg, cna, aur*
C3970	t021	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*sea, sej, [seg, sei, , sem, sen, seo, seu]*[d]	*tsst-1, hla, hlb, hld, hlg, cna, aur*
C3974	t7866[a]	III	ST34/CC30	PEN, TOB, MUP	*blaZ, ant*(4´)-Ia, *mup*(A)	E	*seg, seh, sei, sem, seu*	*hla, hld, hlg, aur*
C3975	t136	III	ST34/CC30	PEN	*blaZ*	G	*seg, seh, sei, sem, sep, seu*	*tsst-1, hla, hlb, hld, hlg, aur*
C3966	t136	III	ST34/CC30	PEN	*blaZ*	B	*seh, sei, sem, seu*	*tsst-1, hla, hlb, hld, hlg, aur*
C4239	t166	III	ST34/CC30	PEN	*blaZ*	B	*seg, seh, sei, sem, seu*	*tsst-1, hla, hld, hlg, aur*
C3962	t084	II	ST15/CC15	ERI, CLI	*erm*(C)	C	*sen*	*hla, hld, hlgv, luk-DE, aur*
C3964	t084	II	ST15/CC15	Negativo	Negativo	C	*sen*	*hla, hld, hlgv, luk-DE, aur*
C3963	t209	II	ST109/CC9	PEN, ERI, CLI	*blaZ, mph*(C), *erm*(A), *erm*(C)	B	*[seg, sei, sem, sen, seo, seu]*[d]	*hla, hlb, hld, hlgv, eta, aur*
C3971	t002	II	ST5/CC5	PEN	*blaZ*	Negativo	*seb, sei, sej, sem, sen, seo*	*hla, hlb, hld, hlgv, luk-DE, aur*
C3967	t002	II	ST5/CC5	Negativo	Negativo	F	*sej, sen, seo, sep*	*hla, hld, hlgv, luk-DE, aur*

[a]Se determinó sólo un MLST por cada tipo *spa* diferente. El resto de ST se asumieron en función de los tipos *spa* y características comúnes de las cepas

[b]Antimicrobianos: ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; TOB, tobramicina.

[c]IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipoA (*scn, chp, sak, sea*), IEC tipo B (*scn, chp, sak*), IEC tipo C (*scn, chp*), IEC tipo E (*scn, sak*), IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep*), IEC tipo G (*scn, sak, sep*)

[d] Cluster *egc*-like (*seg, sei ,sem, sen, seo y seu*)

Pocas cepas presentaron algún tipo de mecanismo de resistencia a antimicrobianos, excepto para la penicilina, donde el gen *blaZ* fue detectado en 9 de las cepas. Tres de las cepas, adscritas a los complejos CC9, CC15 y CC398, presentaron resistencia a eritromicina y clindamicina, detectándose los genes *erm*(A), *erm*(C), *erm*(T) o *mph*(C). Una de las cepas, la tipada como t7866-ST34/CC30, presentó resistencia a tobramicina y mupirocina, detectándose los respectivos determinantes de resistencia *ant*(4`)-Ia y *mup*(A). Cuatro de las cepas presentaron susceptibilidad a todos los antimicrobianos testados en el estudio. (**Tabla 48**).

Una gran variedad de genes codificantes de factores de virulencia fueron detectados. Destaca la alta prevalencia del gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*) que fue detectada en el 40% de las cepas, concretamente en algunas de las cepas pertenecientes a los complejos CC30, CC59 y CC133. Asímismo, es remarcable la detección del gen de la exfoliatina A (*eta*) en la cepa t209-ST109/CC9. Todas las cepas portaban los genes *hlA* (hemolisina alfa) y *hlD* (hemolisina delta). Las demás hemolisinas se encontraron en un número variable de cepas: *hlB* (9 cepas), *hlG* (6 cepas), y *hlGv* (9 cepas). La leucotoxina codificada por el gen *luk-DE* se detectó en 5 de las cepas, mientras que *luk-M* tan solo se detectó en la cepa adscrita al complejo CC133, cepa en la que no se detectó el gen *aur*, presente en el resto de cepas. La proteína de unión al colágeno (codificada por el gen *cna*) tan sólo se detectó en 2 de las cepas, mientras que los genes *lukF/lukS*-PV (leucotoxina de Panton Valentine) o *bap* (proteína asociada a la formación de biofilm) no fueron detectados en ninguno de los aislados.

Teniendo en cuenta el origen de los aislados, se realizó el análisis de los genes de las 18 enterotoxinas y los clústeres asociados, encontrándose el clúster *egc-like* (*seg, sei , sem, sen, seo* y *seu*) en 3 de las cepas, adscritas al CC9 (1) y CC30 (2). Ninguna de las cepas presentaron el cluster *egc* (*seg, sei, sem, sen* y *seo*), aunque si se detectaron diferentes combinaciones de los 18 genes (**tabla 48**).

3.2. Caracterización molecular de aislados de *S. aureus* de muestras nasales y cutáneas de una familia de granjeros de una explotación bovina y ovina

El siguiente objetivo fue estudiar la presencia de *S. aureus* en muestras nasales (y tambien en muestras cutáneas cuando existia lesiones a nivel de la piel) de los miembros de una familia de granjeros (11 miembros fueron incluidos) que poseían distinto nivel de contacto con el ganado (alto, medio o bajo), y caracterizar los aislados obtenidos. Además, se realizó un estudio longitudinal en el tiempo (abril-2013/abril-2014), con el fin de determinar la dinámica de colonización y la estructura poblacional de *S. aureus* existente en este gremio profesional y sus convivientes. En este estudio longitudinal, se tomaron 3 muestras (con frecuencia

semestral, muestreos 1, 2 y 3) tanto de la localizacion nasal y tambien de la cutánea en aquellos casos en los que habia lesión de piel. El criterio de selección se basó en incluir a todos los miembros de la familia excepto aquellos que hubieran tenido estrecho contacto hospitalario de manera prolongada. Posteriormente seleccionamos y clasificamos aquellas que mantuvieran contacto con los animales de la granja (ovejas, vacas, caballos, cabras y perros pastores) en diferente grado. Durante el estudio, uno de los voluntarios desarrolló una ulceración en un pie, necesitando atención médica primaria, pero continuó formando parte del estudio por la sospecha de que en el proceso estuviera implicado *S. aureus* como agente etiológico. En la **Tabla 49** se indican las caracteristicas de los individuos de la familia incluidos en el estudio y su grado de contacto con los animales de la granja: Contacto alto (A), trabajadores continuos en la granja; Contacto medio (M), individuos que vivían en la granja y que trabajaban intermitentemente en ella; Contacto bajo (B), individuos que convivían con los trabajadores de la granja, pero no vivían en la granja ni trabajaban en ella.

Tabla 49. Características de los 11 individuos incluidos en éste estudio y periodos de muestreo a lo largo de 1 año.

Individuo	Edad	Sexo[a]	Contacto animal[b]	Períodos de muestreo nasal (n=31)[c]	Período de muestreo de lesions cutáneas (n=9)[c]
1	29	M	A	**1** , 2, 3	2, **3**
2	34	M	A	**1, 2, 3**	
3	37	M	A	**1**, 2, 3	**2**[d] , 3
4	49	F	M	1, 2, 3	**1, 2, 3**
5	26	F	M	**1, 2**, 3	
6	44	M	M	1, 2, 3	**1**
7	57	M	B	**1, 2,** 3	
8	55	F	B	**1**, 2, 3	
9	61	F	B	**1**, 2, 3	3
10	29	F	B	1, 2	
11	50	F	B	1, 3	

[a]Sexo: M) Masculino; F) Femenino.
[b]Grado de contacto animal: A) Alto contacto, trabajadores continuos en la granja; M) Contacto medio, individuos que vivían en la granja y que trabajaban intermitentemente en ella; B) Contacto bajo, individuos que convivían con los trabajadores de la granja pero no trabajaban en ella.
[c]Períodos con detección de *S. aureus* son mostrados en negrita y subrayado. 1, abril 2013; 2, octubre 2013; 3, abril 2014.
[d]Dos cepas diferentes se recogieron y caracterizaron en éste período

S. aureus fue detectado en 9 de los 11 individuos de la familia analizada, 6 de ellos trabajaban de manera continua o intermitente en la granja (grupo contacto A/M), viviendo 3 de ellos en el propio recinto de la explotación ganadera. Los otros 5 individuos eran convivientes de los anteriores (Grupo de contacto B). A su vez, *S. aureus* fue detectado en muestras nasales de 7 de los 11 individuos, y en muestras cutáneas de 4 de los 5 individuos testados (por tener alguna lesión cutánea). Es interesante remarcar que el 63,6% de los individuos eran portadores nasales de *S. aureus*, siendo un 27,3% portadores continuos (el mismo clon de *S. aureus* en, al menos, 2 muestreos consecutivos analizados) y un 36,3% portadores intermitentes (una cepa de *S. aureus* detectado en un solo muestreo). En total se obtuvieron *S. aureus* en 17 de las 40 muestras analizadas, lo que representó el 42,5% del total. De éstas 40 muestras, 31 procedieron de frotis nasales y las 9 restantes procedieron de muestras cutáneas (**Figura 48**). *S. aureus* fue detectado en el 35,5% de las muestras nasales (11 de 31), y en el 66,6% de la cutáneas (6 de 9). En total se obtuvieron 18 cepas de *S. aureus*, ya que en uno de los individuos se aislaron 2 cepas diferentes de origen cutáneo (individuo 3). Es remarcable que *S. aureus* fue aislado en nariz o piel, en todos los individuos catalogados como de contacto alto/medio con animales (6 individuos). Tan sólo uno de los granjeros (individuo 2) mantuvo el mismo clon de *S. aureus* en los 3 periodos (**Tabla 50**).

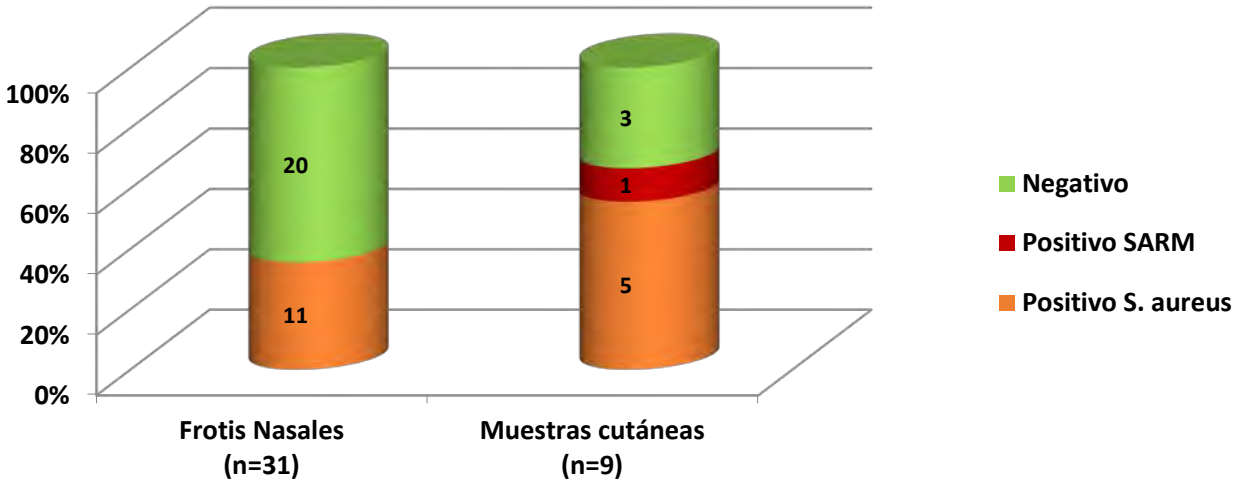


Figura 48. Proporción de cepas *S. aureus* o SARM detectadas en relación al origen de la muestra

Todas las cepas de *S. aureus* presentaron el fenotipo SASM, excepto una de ellas en la que se detectó uno de los determinantes de resistencia a este antibiótico, el *mec*(C), por lo que resultó ser SARM (**Tabla 50**).

La cepa SARM fue tipada como t843-ST130/CC130, con *agr* III y SCC*mec* XI y fue aislada de una lesión cutánea superficial que presentaba el individuo 1, catalogado con alto grado de contacto animal. Es remarcable que en este individuo se recogieron 3 muestras

nasales y 2 muestras procedentes de lesiones cutáneas, siendo positivas para *S. aureus* una muestra nasal y otra cutánea. Durante el período 3, intervalo de tiempo cuando se recogió la cepa SARM, el individuo 1, además de trabajar en la granja del estudio, se encontraba trabajando en la producción tradicional de queso en otra granja muy cercana. La cepa SARM fue sensible a todos los antibióticos no β-lactámicos, presentando sólo resistencia a meticilina y penicilina mediada por los genes *mec*(C) y *blaZ*-SCC*mec*XI, respectivamente. Esta cepa portaba los genes de virulencia de la leucocidina *luk-DE* y de la exfoliatina D2 (*etD2*). A su vez, otra cepa de *S. aureus*, en éste caso SASM, fue aislada de muestra nasal de este individuo durante el período 1, y fue tipada como CC30 (**Tabla 50**).

Las 17 cepas de *S. aureus* restantes, incluída ésta última, presentaron el fenotipo SASM, encontrándose entre ellas una gran variabilidad genética con la detección de 9 tipos *spa* diferentes: t012, t015, t166, t209, t352, t790, t11719, t2155, y t2678. Además, se detectaron 9 secuencias tipo (ST): ST22, ST30, ST34, ST45, ST109, ST121, ST133, ST1333, y ST1842, pertenecientes a 6 complejos clonales diferentes: (CC9, CC22, CC30, CC45, CC121, CC133). Las líneas genéticas predominantes entre las 17 cepas SASM fueron, [ST/CC (% de cepas)]: ST30 o ST34 or ST1333 o ST1842/CC30 (35.3%), ST45/CC45 (23.5%) y ST109/CC9 (17.6%). Es interesante la detección de la cepa t2678-ST133/CC133 en el individuo 4, quien vivía en el recinto de la granja y trabajaba esporádicamente en ella. El tipo *agr* más frecuentemente detectado fue el *agr* I (7 cepas), seguido del *agr* II (6 cepas), *agr* III (4 cepas) y *agr* IV (1 cepa) (**Figura 49 y Tabla 50).**

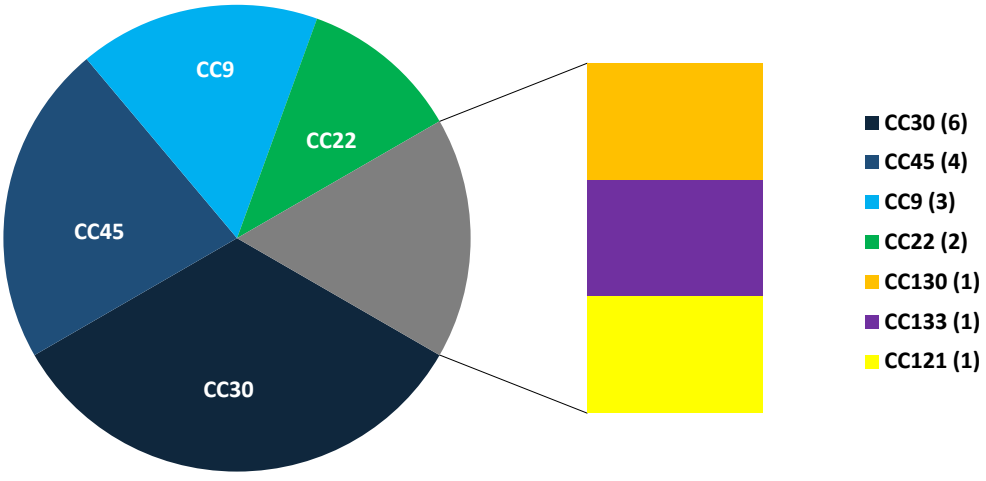


Figura 49. Distribución de los complejos clonales predominantes entre las 18 cepas *S. aureus* aisladas de muestras nasales y cutáneas procedentes de 9 de los 11 individuos de la familia de granjeros

Se encontró una gran diversidad de determinantes de virulencia entre las 17 cepas SASM. Es interesante que 3 de las cepas recogidas de lesiones cutáneas del mismo individuo

(individuo 4) pertenencientes a los complejos clonales CC133 y CC30 presentaron el gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*). Este individuo fue el que desarrolló la ulceración en el pie, tras el inicio del estudio. En otras 6 cepas, adscritas a los complejos CC9 o CC30, se detectó el gen de la exfoliatina A (*eta*). El gen *luk-DE* fue detectado en 7 de las cepas, mientras que el gen *luk-M* tan sólo fue detectado en la cepa perteneciente al complejo CC133. Destaca la presencia del gen de la proteína de unión al colágeno (*cna*) en 8 de las cepas, especialmente en aquellas adscritas a los complejos CC22, CC30 y CC45. (**Tabla 50**).

En ninguna de las cepas se detectaron las toxinas codificadas por los genes *lukF/lukS*-PV, *etb*, *etd* o *bap*.

Los perfiles de resistencia a antimicrobianos detectados entre las 17 cepas SASM fueron los siguientes, (antimicrobiano, [% de cepas resistentes/genes detectados]): penicilina [100%/*blaZ*]; eritromicina [23.5%/*msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *erm*(A), *erm*(C)] and clindamicina [23.5%]; kanamicina [11.8%/*aph(3´)-IIIa*], tetraciclina [5.9%/*tet*(K)], mupirocina [17.7%/*mup*(A)], estreptomicina [5.9%,*str*] y ácido fusídico [5.9%)/*fus*(C)]. Aunque en general los fenotipos de resistencia entre las cepas de origen nasal y origen cutáneo son parecidos en cuanto a β-lactámicos y aminoglucosidos, se observa una mayor variabilidad entre las cutáneas abarcando un mayor número de antimicrobianos. (**Figura 50**).

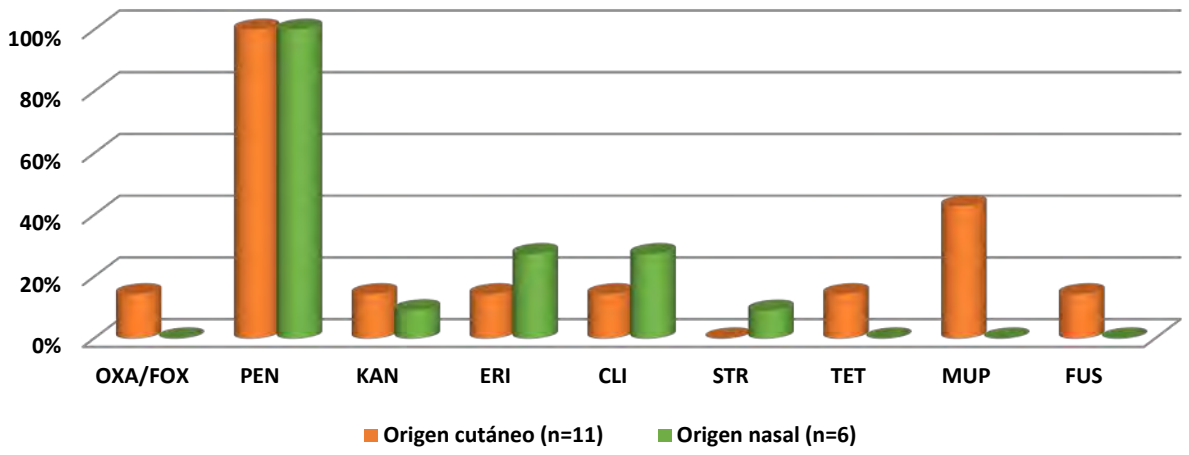


Figura 50. Comparativa de los fenotipos de resistencia entre las cepas de origen cutáneo y nasal. OXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; KAN, kanamicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; STR, estreptomicina; TET, tetraciclina; MUP, mupirocina; FUS, ácido fusídico.

Tabla 50. Características de los 18 *S. aureus* aislados de muestras nasales y cutáneas de la familia de granjeros incluidos en este estudio, procedentes de 9 de 11 individuos testados

Individuo	Contacto animal[a]	Origen[b]	Periodo[c]	Nº cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de virulencia	
					spa-type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC[d]	Fenotipo[e]	Genotipo	IEC [f]	Otros genes
1	A	FN	1	1	t166	III	-	ST34/CC30	PEN, KAN, STR	*blaZ, aph(3´)-III, str*	B	*eta*
		FC	3	1	t843	III	XI	ST130/CC130	PEN, OXA, FOX	*mecC, blaZv*-SCC*mec* XI	-	*luk-DE, etd2*
2	A	FN	1/2/3	1/1/1	t209	II	-	ST109/CC9	PEN, ERI, CLI	*blaZ, erm(A), erm(C)*	B	*eta, luk-DE*
3	A	FN	1	1	t012	II	-	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*eta, luk-DE*
		FC	2	1	t012	II	-	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*eta, luk-DE*
		FC	2	1	t11719	II	-	ST1333/CC30	PEN, ERI, CLI, TET, FUS, MUP	*blaZ, msr(A), msr(B), mph(C), erm(A), erm(C), tet(K), fus(C), mup(A)*	-	*cna*
4	M	FC	1	1	t2678	I	-	ST133/CC133	PEN, KAN	*blaZ, aph(3´)-III*	-	*tsst-1, luk-DE, luk-M*
		FC	2	1	t352	III	-	ST1842/CC30	PEN, MUP	*blaZ, mup(A)*	A	*tsst-1*
		FC	3	1	t352	III	-	ST1842/CC30	PEN, MUP	*blaZ, mup(A)*	A	*tsst-1*
5	M	FN	1/2	1/1	t790	I	-	ST22/CC22	PEN	*blaZ*	B	*cna*
6	M	FC	1	1	t2155	IV	-	ST121/CC121	PEN	*blaZ*	B	*cna*
7	B	FN	1/2	1/1	t015	I	-	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*cna*
8	B	FN	1	1	t015	I	-	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*cna*
9	B	FN	1	1	t015	I	-	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*cna*

[a]Grado de contacto animal: A) Contacto alto, trabajdores continuos; M) Contacto Medio, individuos que vivían en la granja y eran trabajadores intermitentes;B) Contacto Bajo, personas que convivían con los trabajadores de la granja

[b]FN: frotis nasales; FC: frotis cutáneos de pequeñas lesiones

[c]Períodos de muestreo: 1) tiempo cero, abril 2013; 2) a los 6 mese, octubre 2013; 3) a los 12 meses, abril 2014.

[d]Se determine el MLST en una cepa por cada *spa*-type.

[e]Antimicrobials: PEN, penicilina; OXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomicina; FUS, ácido fusidico; TET, tetraciclina; MUP, mupirocina.

4. ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE *S. aureus* A TRAVÉS DE LA LACTANCIA MATERNA Y NIVEL DE IMPLANTACIÓN INTESTINAL EN LOS LACTANTES

El siguiente objetivo que nos planteamos fue determinar si la leche materna podria ser una fuente de *S. aureus* para el neonato y si estas bacterias podrían colonizar el intestino del recién nacido. Por ello, se llevó a cabo un estudio en colaboración con el Servicio de Pediatría del Hospital Juan XXIII (Tarragona), y la Universidad Complutense de Madrid y se analizaron 21 parejas madres lactantes-neonatos, con el objetivo de determinar la posible transferencia de S*. aureus* a través de la lactancia materna y el nivel de implantación de este microorganismo en el intestino de los lactantes. Para ello se tomaron muestras de la lecha de la madre y de las heces de los niños a los 7, 14 y 35 dias del nacimiento del niño. Estas muestras fueron testadas para el aislamiento de *S. aureus*.

Se aisló *S. aureus* en 6 de las 21 madres testadas (28,6%) y en 12 de los 21 lactantes analizados (57,1%). En total se recogieron 41 cepas de *S. aureus*, siendo 16 de ellas procedentes de las madres (39%) y 25 de los niños lactantes (61%).

En concreto, se obtuvo *S. aureus* en las muestras fecales de 2 de los lactantes a los 7 días del nacimiento (16,6%), en 3 de los lactantes en el día 14 (25%) y en 10 de los lactantes en el día 35 (83,3%). Además, *S. aureus* fue detectado en ambas muestras (leche en madres y muestras fecales de lactantes) de 6 de los 21 casos estudiados (**Tabla 51**).

Del total de 41 cepas estudiadas, 18 de ellas resultaron ser resistentes a meticilina mostrando resistencia a oxacilina y cefoxitina y siendo positivas para el gen *mec*(A). Estas 18 cepas SARM fueron obtenidas en 2 de las 21 madres testadas (9,6%) y en 5 de los 21 lactantes estudiados (23,8%). Las 23 cepas restantes fueron caracterizadas como SASM por la ausencia de resistencia a oxacilina/cefoxitina y por no albergar ninguno de los determinantes de resistencia a meticilina.

Entre las cepas SARM y SASM se encontró una considerable diversidad genética, detectándose 12 tipos *spa* diferentes: t002, t012, t015, t021, t122, t136, t148, t166, t322, t440, t5204 y el nuevo spa t10664, registrado en la base de datos Ridom Spa Server. Asímismo se detectaron 7 secuencias tipo (ST5, ST8, ST15, ST30, ST34, ST45, ST1434, and ST1869) adscritas a 6 complejos clonales diferentes (CC5, CC8, CC15, CC30, CC45, and CC72) (**Figura 51**). Los tipos *agr* mayoritarios fueron el *agr* II (18 cepas) y *agr* III (15 cepas) (**Tablas 52 y 53**).

Tabla 51. Cepas *de S. aureus* obtenidas de los lactantes y de sus madres en los 12 casos positivos detectados de las 21 parejas madre-niño analizadas

Casos	Aislados fecales de niños lactantes			Aislados de leche materna
	7 dias	14 dias	35 dias	
Caso 1		C5515		C6429 to C6436
Caso 2	C5522, C5523	C5524, C5525	C5526, C5527	C6438
Caso 3			C5518, C5519, C5520, C5521, C5535, C5536, C5537	C6437
Caso 4			C5508	C5509
Caso 5		C5513	C5514	
Caso 6			C5516	C5517
Caso 7			C5507	
Caso 8			C5511, C5512	
Caso 9			C5529	
Caso 10			C5530	
Caso 11			C5531	
Caso 12	C5533			C5532, C5534, C6439, C6440

Todas las cepas SARM fueron tipadas como ST5/CC5 (*spa* t002 o t322) presentándo SCC*mec* IV y representaron el 43,9% del total de cepas analizadas en el estudio. Entre las cepas SASM existió algo más de variabilidad aunque la línea genética predominante fue CC30, representando un 36,6% del total de cepas estudiadas y un 65,2% de las cepas SASM.

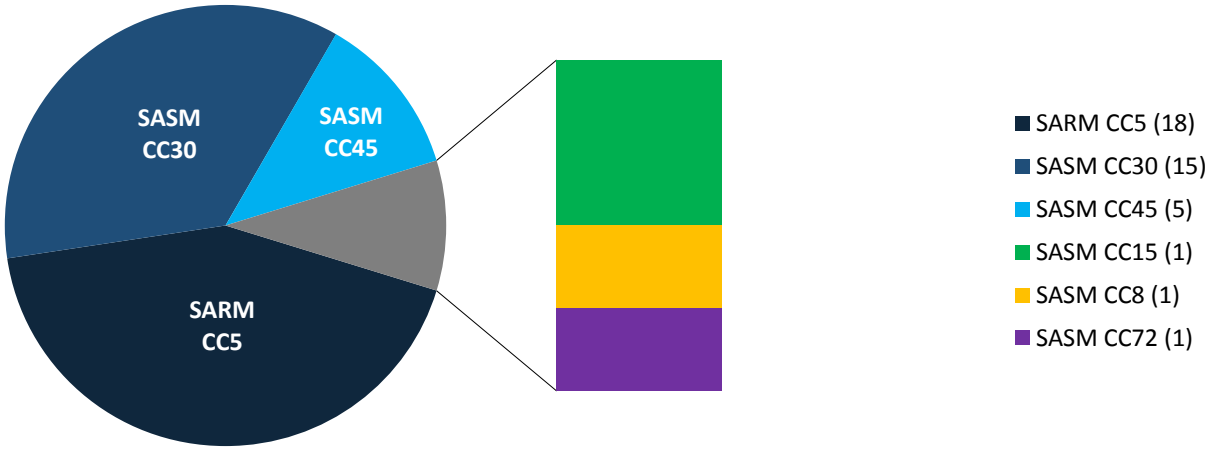


Figura 51. Distribución de los complejos clonales predominantes entre las 41 cepas *S.aureus* procedentes de madres y lactantes.

Tabla 52. Características de los 26 aislados de *S. aureus* obtenidos en los 4 casos con transferencia potencial madre-lactante.

Caso	Origen	SARM/ SASM	Nº Cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de Virulencia	
				spa-type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC[a]	Fenotipo[b]	Genotipo	IEC[c]	Otros genes[d]
Casos de transferencia potencial madre-lactante											
1	Lactante	SARM	1	t322	II	IV	ST5/CC5	ERI, CLI, GEN, TOB	*erm(C), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia*	F	*luk-DE, aur*
	Madre	SARM	7	t322	II	IV	**ST5/CC5**	ERI, CLI, GEN, TOB, KAN	*erm(C),lnu(A), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia, aph(3´)-III3*	F	*luk-DE, aur*^{2}, *eta*^{2}
	Madre	SASM	1	t136	III	-	**ST34/CC30**	-	-	B	*luk-DE, aur, tsst-1*
2	Lactante	SARM	5	t322	II	IV	ST5/CC5	ERI, CLI, GEN, TOB	*erm(C), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia*	F	*luk-DE, aur*
	Madre	SARM	1	t322	II	IV	**ST5/CC5**	ERI, CLI, GEN, TOB, KAN	*erm(C), lnu(A), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia*	F	*luk-DE, aur, eta*
	Lactante	SASM	1	t136	III	-	ST34/CC30	-	-	E	*aur, tsst-1*
3	Lactante	SASM	4	t015	I	-	ST45/CC45	-	-	B	*aur, cna*
	Lactante	SASM	3	t136	III	-	ST34/CC30	-	-	E	*luk-DE, eta, aur, tsst-1*
	Madre	SASM	1	t136	III	-	**ST34/CC30**	-	-	E	*luk-DE, eta, aur, tsst-1*
4	Lactante	SASM	1	t021	III	-	**ST1869/CC30**	-	-	-	*aur, cna, tsst-1*
	Madre	SASM	1	t021	III	-	ST1869/CC30	-	-	-	*aur, cna, tsst-1*

[a] Aquellos STs/CCs que fueron obtenidos por MLST están marcados en negrita. El resto de STs/CCs fueron asignados en función del *spa*-type.
[b] Antimicrobianos: ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina
[c] IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo B (*scn, chp, sak*)IEC tipo E (*scn, sak*); IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep*)
[d] El superíndice indica el número de cepas en aquellos casos en los que no todas las cepas del grupo tienen la característica indicada

Tabla 53. Características de los 15 aislados de *S. aureus* obtenidos del resto de casos donde no se demostró transferencia madre-lactante

Caso	Origen	SARM/ SASM	Nº Cepas	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de Virulencia	
				spa-type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC[a]	Fenotipo[b]	Genotipo	IEC[c]	Otros genes
Casos sin potencial de transferencia											
5	Lactante	SARM	2	t322	II	IV	**ST5/CC5**	ERI, CLI, GEN, TOB	*erm(C), aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia*	F	*luk-DE, aur*
6	Lactante	SASM	1	t015	I	-	ST45/CC45	STR	*str*	F	*luk-DE, aur, cna*
	Madre	SASM	1	t021	III	-	ST30/CC30	-	-	-	*aur, cna, tsst-1*
7	Lactante	SARM	1	t002	II	IV	ST5/CC5	ERI, GEN, TOB, STR, FUS, CIP	*msrA, mrsB, aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia, str, fus(C)*	E	*luk-DE, aur*
8	Lactante	SASM	1	t012	III	-	ST30/CC30	-	-	A	*luk-DE, aur, cna, tsst-1*
	Lactante	SASM	1	t5204	II	-	ST15/CC15	-	-	C	*luk-DE, aur*
9	Lactante	SASM	1	t122	III	-	ST30/CC30	STR	*str*	A	*aur, cna, tsst-1*
10	Lactante	SASM	1	t10664	I	-	ST8/CC8	-	-	B	*aur, cna*
11	Lactante	SASM	1	t148	I	-	**ST1434/CC72**	-	-	B	*luk-DE*
12	Lactante	SARM	1	t322	II	IV	ST5/CC5	STR	*str*	F	*luk-DE, aur*
	Mother	MSSA	3	t166	III	-	ST34/CC30	-	-	-	*luk-DE, aur, tsst-1, eta1*
	Mother	MSSA	1	t440	III	-	ST30/CC30	-	-	B	*aur, cna, tsst-1*

[a] Aquellos STs/CCs que fueron obtenidos por MLST están marcados en negrita. El resto de STs/CCs fueron asignados en función del *spa*-type.
[b]Antimicrobianos: ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; STR, estreptomicina; FUS, ácido fusídico y CIP, ciprofloxacino
[c]IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo A(*scn, chp, sak, sea*), IEC tipo B (*scn, chp, sak*); IEC tipo C (*scn, chp*); IEC tipo E (*scn, sak*); IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep*)

Todas las cepas SASM resultaron sensibles a todos los antibióticos testados, excepto en el caso de 2 cepas adscritas a los complejos CC30 y CC45, que presentaron resistencia a estreptomicina, conteniendo el gen *str* (**Tabla 53**).

En el caso de las 17 cepas SARM tipadas como t322-ST5/CC5, presentaron un fenotipo de multirresistencia a eritromicina, clindamicina y aminoglucósidos y contenían en su mayoría los determinantes de resistencia *erm(C)*, *aac(6´)-Ie-aph(2")*, *ant(4´)-Ia, y aph(3´)-III*, además 2 de éstas cepas presentaron el gen *lnu*(A) responsable de la resistencia a clindamicina. Por otro lado, la cepa SARM tipada como t002-ST5/CC5 también presentó multirresistencia a eritromicina [con genes *msr*(A), *mrs*(B)], aminoglucósidos [genes *aac(6´)-Ie-aph(2"), ant(4´)-Ia*], estreptomicina [mediada por el gen *str*] y ácido fusídico [gen *fus*(C)].

Respecto al perfil de virulencia de las 41 cepas estudiadas, se encontró un número variable de estos genes. Destacando que todas las cepas del CC30 contenían el gen *tsst-1*, codificante de la toxina del síndrome del shock tóxico, representando un 36,6% del total de cepas estudiadas. Además, en 5 de estas cepas también se detectó la toxina de la exfoliatina A (*eta*), detectada también en 3 cepas SARM-CC5, lo que en total supuso una prevalencia del 19,1% de ésta toxina. El gen de la leucotoxina *luk-DE* se detectó en 30 cepas (73,2% del total), siendo 18 de ellas SARM y las 12 restantes SASM. Por otro lado, el gen *aur* se detectó en 35 de las cepas, mientras que el gen de la proteína de unión al colágeno se encontró en 12 de las cepas, principalmente entre aquellas pertenecientes a CC30 y CC45. Todas las cepas fueron negativas para los genes de virulencia *lukF/lukS-PV, lukM*, *bap*, *etb*, o *etd*.

Dada la naturaleza del estudio, es importante destacar que la toxina *tsst-1* fue detectada en 5 de las cepas procedentes de muestras fecales de lactantes y en 2 de los casos también fue detectada en las cepas procedentes de la leche materna (caso 3 y 4). En los casos 2 y 5 se observó una persistencia del mismo clon de *S. aureus* (t322-ST5/CC5) en al menos 2 períodos, evidenciando una posible implantación intestinal. Para el resto de casos no se observaron resultados similares.

En 4 de los casos estudiados se constató por tipado molecular la presencia del mismo clon de *S. aureus* tanto en la leche materna como en las muestras fecales de los lactantes. Fue por ello por lo que se realizó un estudio comparativo mediante PFGE para cerciorarnos de la clonalidad e identidad epidemiológica de éstas cepas. Para ello se seleccionaron 13 cepas representativas de las 26 que formaban parte de éstos casos, y se procedió a su análisis por PFGE mediante la digestión del ADN total con la enzima *SmaI* (**Figura 52 y tabla 54**).

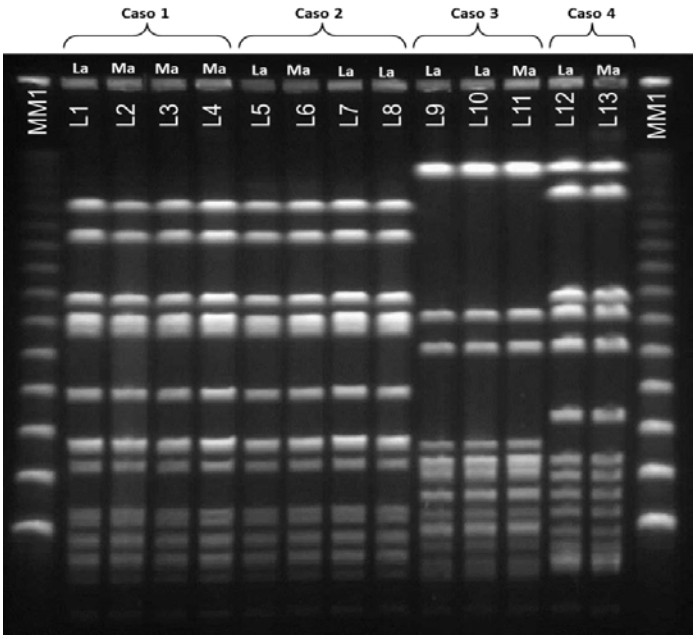


Figura 52. Resultado del análisis por PFGE-*SmaI* de las cepas de *S. aureus* pertenecientes a los 4 casos con potencial transferencia madre-lactante. Las líneas 1 a 8 pertenecen a aislados de los casos 1 y 2. Las líneas 9 a 11 pertenecen a aislados del caso 3. Las líneas 12 y 13 pertenecen a las cepas del caso 4.

Se obtuvieron 3 patrones PFGE diferentes pero se confirmó la idéntica clonalidad entre las cepas SARM-t322-ST5/CC5 compartidas por madres y lactantes en los casos 1 y 2 con patrón PFGE-A. De la misma manera fueron confirmados idénticos patrones clonales para las cepas SASM-t136-ST34/CC34 compartidas en el caso 3 con patrón PFGE-B y para las cepas SASM-t021-ST1869/CC30 compartidas en el caso 4 con patrón PFGE-C. (**Tabla 54**).

Tabla 54. Cepas incluidas en el estudio de la clonalidad por PFGE, algunas de sus características moleculares y patrones PFGE encontrados.

Casos	Análisis de PFGE			
	Cepas[a]	*spa-type*	MLST	Patrones PFGE
Caso 1	**C5515**, C6429, C6433, C6435	t322	ST5	A
Caso 2	**C5522**, **C5524**, **C5526**, C6438	t322	ST5	A
Caso 3	**C5520**, **C5537**, C6437	t136	ST34	B
Caso 4	**C5508**, C5509	t021	ST1869	C

[a]Las cepas en negrita y subrayado corresponden a las cepas seleccionadas entre las encontradas en los lactantes. El resto tienen su origen en la leche materna

5. ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *S. aureus* EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

El siguiente objetivo fue determinar el papel de los alimentos de origen cárnico como posible fuente de *S. aureus* para el hombre**.** Para ello se testaron 100 muestras de carne obtenidas de diferentes carnicerias y grandes superficies de La Rioja.

De las 100 muestras de origen cárnico testadas se obtuvieron un total de 7 cepas de *S. aureus*, lo que representó una tasa de contaminación por este microorganismo del 7%. Cinco de las muestras contaminadas procedían de pequeñas carnicerías, mientras que las otras 2 muestras procedían de grandes superficies. Teniendo en cuenta que de las 100 muestras, 55 eran de pequeñas carcinerías locales y 45 eran de grandes superficies, la tasa de contaminación por *S. aureus* variaba, siendo del 9,1% y del 4,4%, respectivamente. Una de las cepas estudiadas entre las aisladas en pequeñas carnicerias resultó ser SARM presentando el gen de resistencia a meticilina *mec*(A) por lo que la tasa de contaminación por SARM se fijó en el 1% del total de muestras cárnicas estudiadas. Cuando consideramos el tipo de carne, la tasa de contaminación por *S. aureus* y SARM en carne de cerdo fue del 11,7% y del 2,9%, respectivamente. Respecto a la carne procedente de pollo, la tasa de contaminación por *S. aureus* fue del 10%, sin encontrar ninguna cepa SARM. No se detectó contaminación por este microorganismo en el resto de orígenes cárnicos analizados (**Figura 53**).

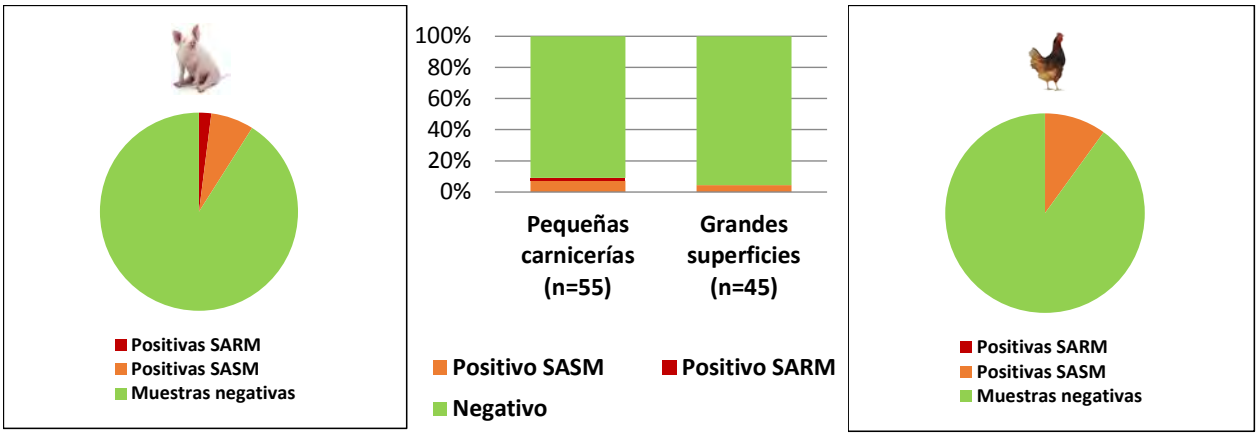


Figura 53. Proporción de muestras de carne de cerdo contaminadas por *S. aureus* (n=35) a la izquierda. Proporción de muestras cárnicas contaminadas por *S. aureus* en el total de muestras estudiadas (n=100) en el centro. Proporción de carne de pollo contaminadas por *S. aureus* (n=31) a la derecha.

La cepa SARM, aislada de carne de cerdo, fue tipada como t011-ST398/CC398 con *agr* I y SCC*mec* V. Además de resistencia a β-lactámicos, se detectó resistencia a eritromicina y clindamicina (mediadas por el gen *erm*(C)), a tetraciclina (genes *tet*(K), *tet*(M)) y estreptomicina (gen *str*). Su perfil de virulencia presentó una combinación de genes de

hemolisinas (*hlA, hlB, hlD, hlG*), de la aureolisina (*aur*) y el gen *cna*, no presentando ningún cluster de genes de enterotoxinas conocido.

Las otras 6 cepas, tres procedentes de cerdo y otras tres de pollo, fueron sensibles a meticilina (SASM). Tres de ellas fueron tipadas como t015-ST45/CC45 con *agr* I, con resistencia sólo a penicilina (gen *blaZ*), presentando el cluster *egc-like* (*seg, sei, sem, sen, seo, seu*) y los genes *cna*, *hlG* y *hlD*. Las 3 cepas adscritas al CC45 procedían de pollo (2) y cerdo (1). De las tres restantes, encontramos en carne de pollo otra cepa adscrita al CC45-*agr* I pero con *spa* t305 y ST617, presentando resistencia a tetraciclina mediada por el gen *tet*(M) y un perfil de virulencia distinto al de sus homólogas con los siguientes genes *luk-DE, hlGv, hlD*; además carecia de clúster de enterotoxinas estafilocócicas. Las 2 últimas cepas fueron tipadas como t002-ST5/CC5-*agr* II (aislada en cerdo) y t209-ST109/CC9-*agr* II (aislada en pollo), ambas tenían en común el cluster enterotoxigénico estafilocócico *egc* (*seg, sei, sem, sen, seo*), pero mientras la cepa CC5 presentaba resistencia a tetraciclina mediada por el gen *tet*(K), la cepa CC9 presentaba resistencia a eritromicina y clindamicina mediada por el gen *erm*(A). Entre los perfiles de virulencia de éstas 2 cepas encontramos los genes *hlD, hlGv, aur y luk-DE* (CC5) y los genes *hlD, aur* y *eta* (CC9) (**Figura 54 y tabla 55)**.

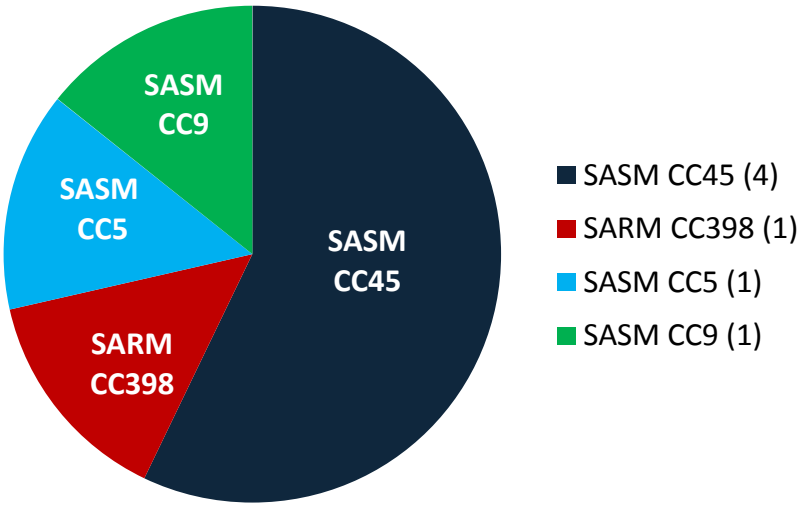


Figura 54. Distribución de las líneas genéticas detectadas entre las cepas *S. aureus* aisladas de las 100 muestras cárnicas.

Tabla 55. Características de las 7 cepas *S. aureus* detectadas en las muestras cárnicas analizadas

Cepa	Origen	Tipado Molecular				Resistencia a antimicrobianos		Factores de Virulencia	
		***spa*-type**	***agr***	**SCC*mec***	**MLST/CC**	**Fenotipo**[a]	**Genotipo**	**IEC**[b]	**Otros genes**
C5932	Cerdo	t011	I	V	ST398/CC398	OXA, FOX, PEN, ERY, CLI, TET, STR	*mecA, blaZ, erm*(C), *tet*(M), *tet*(K), *str*	Negative	*hla, hlb, hld, hlg, cna, aur*
C5934	Cerdo	t002	II	Negativo	ST5/CC5	TET	*tet*(K)	B	*luk-DE, hlgv, hld, aur, egc*[c]
C5933	Cerdo	t015	I	Negativo	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*hlg, hld, cna, aur, egc-like*[d]
C5938	Cerdo	t015	I	Negativo	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*hlg, hld, cna, aur, egc-like*[d]
C5935	Pollo	t015	I	Negativo	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*hlg, hld, cna, aur, egc-like*[d]
C5937	Pollo	t305	I	Negativo	ST617/CC45	TET	*tet*(M)	D	*luk-DE, hlgv, hld*
C5936	Pollo	t209	II	Negativo	ST109/CC9	ERI, CLI	*erm*(A)	B	*eta, hld, aur, egc*[c]

[a]OXA: oxacilina, FOX: cefoxitina, PEN: penicilina, ERI: eritromicina, CLI: clindamicina, TET: tetraciclina, STR: estreptomicina.
[b]IEC: Immune Evasion Cluster. IEC tipo B (*scn, chp, sak*) and IEC tipo D (*scn, sak, sea*).
[c]egc cluster (*seg, sei, sem, sen, seo*)
[d]egc-like cluster (*seg, sei, sem, sen, seo, seu*)

6. CLÚSTER ESTAFILOCÓCICO DE GENES DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE HUMANO (IEC). RESULTADOS GLOBALES DE CEPAS DE DIFERENTES ORÍGENES.

A lo largo de la exposición de resultados de este trabajo se ha incluído el IEC como una parte más de los factores de virulencia de las cepas de *S. aureus* y esta información ha sido incorporada en cada tabla que agrupaba las distintas cepas de *S. aureus* procedentes de diferentes orígenes caracterizadas en esta tesis

Dada la importancia de este sistema de genes mediado por EGMs en el proceso evolutivo de adaptación de *S. aureus* a diferentes huespedes, procedemos a exponer todos los resultados relacionados con el clúster de genes de evasión del sistema inmune humano de una manera global y visual. Subdividiremos los resultados en 2 apartados: 1) los tipos IEC mayoritarios detectados en cada tipo de estudio y 2) los tipos IEC mayoritarios asociados a líneas genéticas considerando el global de las 392 cepas pertenecientes que han sido caracterizadas en esta tesis.

6.1. Tipos IEC mayoritarios detectados en cada estudio

Cepas clínicas SARM procedentes de hemocultivos y otros orígenes

Entre las 39 cepas procedentes de hemocultivos estudiadas se encontraron 6 tipos diferentes IEC, siendo mayoritario el IEC tipo F, representando el 64,1% del total. En un porcentaje del 2,6% de las cepas se encontraron los IEC tipo A, B, E y G, respectivamente. Un 23% de las cepas no presentaron ningún tipo de IEC, cepas adscritas a ST125 (8) y ST5 (1). El tipo F fue detectado mayoritariamente entre las cepas tipadas como t067-ST125/CC5.

De las 105 cepas clínicas SARM de otros orígenes estudiadas (no hemocultivos), se detectaron 6 tipos IEC diferentes, siendo mayoritario el tipo F (56%) seguido de lejos por el IEC tipo D (9,5%). Con frecuencias comprendidas entre <1%-6,6% fueron detectados los tipos A, B, E y G. Un 21% de las cepas no presentaron ningún tipo de IEC entre las que se encontraron las cepas adscritas al ST125/CC5 (14), ST398/CC398 (3), ST228/CC228 (2) y ST8/CC8 (2). La línea genética mayoritaria entre las cepas IEC F fue t067-ST125/CC5 (53), en el caso de las cepas con IEC tipo D todas resultaron pertenecer a la línea genética ST228/CC228 (10).

Si consideramos la proporción de tipos IEC relacionadas con los diferentes orígenes de las cepas, incluyendo los hemocultivos, encontramos mayor diversidad entre las cepas procedentes de muestras de control epidemiológico, piel y partes blandas y aparato respiratorio. Destacando entre las demás las cepas procedentes de hemocultivos, heridas

quirúrgicas y orina con una gran hegemonía del tipo IEC F. No se detectó el IEC tipo C en ninguna de las 105 cepas del estudio (**Figura 55**).

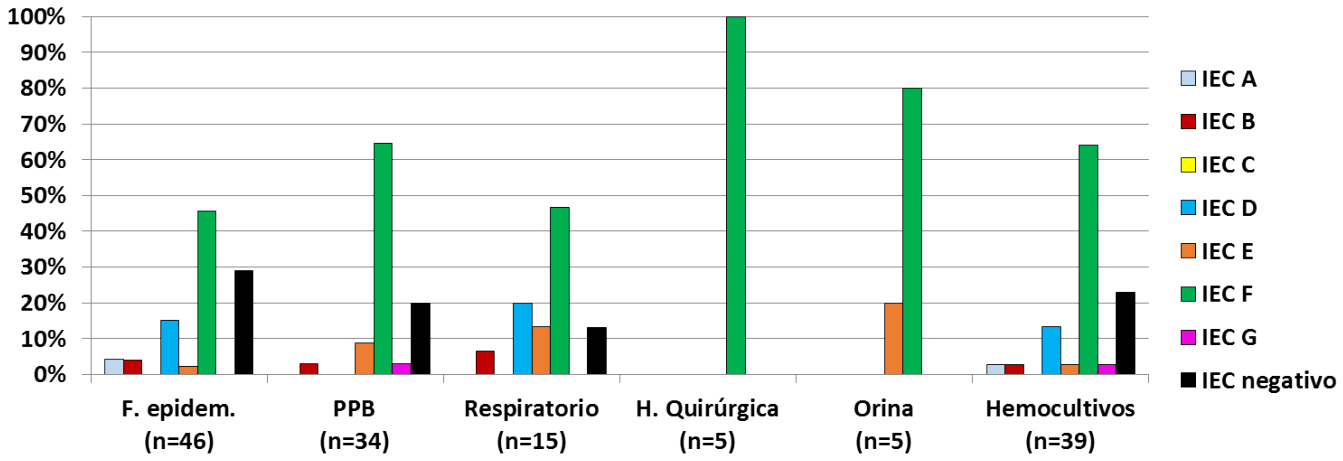


Figura 55. Distribución de los distintos tipos IEC detectados en cepas clínicas SARM en relación con los distintos orígenes de las mismas.

Por último, todas las cepas procedentes del caso clínico de la forunculosis resultaron ser IEC tipo B.

Cepas clínicas SASM procedentes de pacientes con Dermatitis Atópica (DA)

Del total de 40 cepas SASM estudiadas de pacientes con DA, en todas se detectó algún tipo IEC, encontrándose 5 tipos IEC diferentes, siendo mayoritario el tipo F (45%), seguido del tipo B (25%), A (20%), C (7,5%) y E (2,5%). Entre las cepas de tipo F se observó una alta variabilidad genética representada por las líneas genéticas adscritas a ST5/CC5 (6), ST45/CC45 (2), ST109/CC9 (2), ST8/CC8 (2), ST1952/CC59 (1) y ST1842/CC30 (1). Variabilidad extrapolable a los otros 2 tipos IEC mayoritariamente detectados, IEC A y B. Si consideramos la proporción de tipos IEC relacionados con el origen de las muestras, encontramos que el tipo F destaca entre las cepas de origen cutáneo con el 50%, mientras que la proporción está más repartida entre las cepas de origen nasal. Por otro lado, si consideramos el tipo de IEC detectado respecto de la severidad de los procesos de DA (SCORAD), observamos diferencias entre los 3 grupos, siendo más frecuente el IEC F (66,6%) entre las cepas aisladas de pacientes con SCORAD severo. Proporciones más repartidas encontramos entre las cepas aisladas de pacientes con SCORAD moderado siendo mayoritarios IEC F (34,8%), IEC B (34,8%) e IEC A (21,7%). En el caso de las cepas aisladas de pacientes con SCORAD leve, tan sólo se detectaron 2 cepas que presentaron el IEC A e IEC B (**Figura 56**).

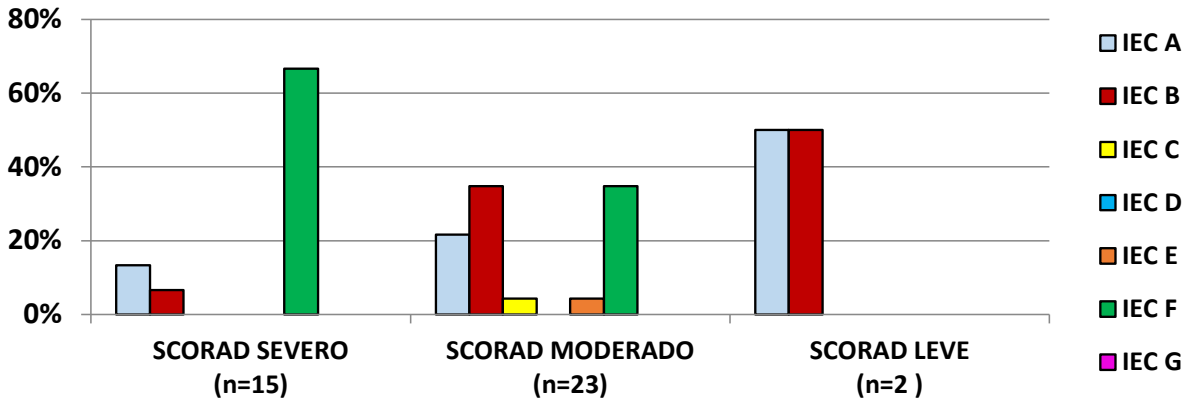


Figura 56. Distribución de los distintos tipos IEC detectados relacionados con los distintos origenes de las cepas clínicas SASM estudiadas en pacientes con DA

Cepas clínicas SARM con criterio de selección TET^R

Entre las 98 cepas clínicas SARM-TET^R del Hospital UMS-Z, se encontró una baja prevalencia de tipos IEC, resultándo negativas todas las cepas adscritas a la línea ST398/CC398 (59) y otras 3 cepas ST6 (1), ST45 (1) y ST59 (1), que representaron el 63,2% del total. Del 36,8% restante de las cepas, el 20,4% presentaron IEC tipo E (fundamentalmente representado por la línea ST1/CC1), un 12,2% presentaron tipo F (representadas en su mayoría por las cepas adscritas al CC5-ST5 o ST125) y el restante 4% estuvo agrupado en otros tipos como el B (ST25/CC25), D (ST8/CC8) y G (CC5-ST5 o ST125). No se detectaron cepas pertenecientes a los IEC tipo A o C.

Cepas clínicas SARM/SASM de casos clínicos con criterio de selección TET^R

Todas las cepas *S. aureus* pertenecientes a la línea ST398/CC398, procedentes de los casos clínicos 1, 2 y 3, carecían de IEC, tanto las aisladas de humanos como las aisladas en cerdos. Las cepas SASM pertenecientes a la línea ST30/CC30 estudiadas en el caso 1 resultaron contener los genes que conformaban el IEC D. Respecto a la cepa SARM ST398/CC398 del caso clínico 4 presentó IEC tipo A, siendo la única cepa SARM ST398/CC398 que presentaba algún tipo de IEC de todas las cepas similares estudiadas en esta tesis.

Cepas SASM procedentes de muestras fecales de individuos sanos

Se encontró una gran diversidad de tipos IEC entre los 15 *S.aureus* estudiados, siendo predominantes los tipos B y C englobando un 26,6% de las cepas cada uno. En ninguna de las cepas se detectó el IEC D. Tan sólo 2 cepas adscritas a ST5/CC5 y ST133/CC133 carecían del sistema IEC. Es destacable la detección del IEC tipo C en la cepa SASM tipada como t571-ST398/CC398.

Cepas *S. aureus* procedentes de personas sanas con diferente contacto animal

Del total de 18 cepas estudiadas, el 61% de ellas presentaron IEC B (fundamentalmente las cepas pertenecientes a las líneas ST22, ST30, ST45 y ST121), mientras que el 22,2% de las cepas fueron adscritas al tipo A (cepas CC30). Tan sólo las cepas SASM tipadas como t11719-ST1333/CC30 y t2678-ST133/CC133 y la cepa SARM t843-ST130/CC130 resultaron negativas para cualquier tipo de IEC.

Cepas *S. aureus* procedentes del estudio de transferencia madres-lactantes

De las 41 cepas estudiadas se encontró que 18 de ellas poseían el IEC tipo F, representando el 43,9% del total, fundamentalmente asociada a la línea SARM t322-ST5/CC5. Los tipos B y E le siguieron como más prevalentes dentro de este grupo de cepas con 19,5% y un 14,6%, respectivamente, aunque con mayor diversidad clonal que el anterior y en cepas SASM. A su vez el IEC tipo A fue detectado en 2 cepas, mientras que el tipo C tan sólo en una cepa. Seis de las cepas carecían del sistema IEC, adscritas al CC30-ST30 o ST34 o ST1869. El IEC tipo D no se encontró entre ninguno de los aislados de este estudio.

Cepas *S. aureus* procedentes de muestras cárnicas

En este caso, todos las cepas SASM fueron positivas para el sistema, siendo el IEC tipo B y D los más prevalentes representando el 71,4% y el 14,2% del total, respectivamente. Tan sólo la cepa SARM t011-ST398/CC398 careció de los genes del clúster IEC.

La figura 57 muestra la proporción de tipos IEC en función del origen de las cepas de *S. aureus*.

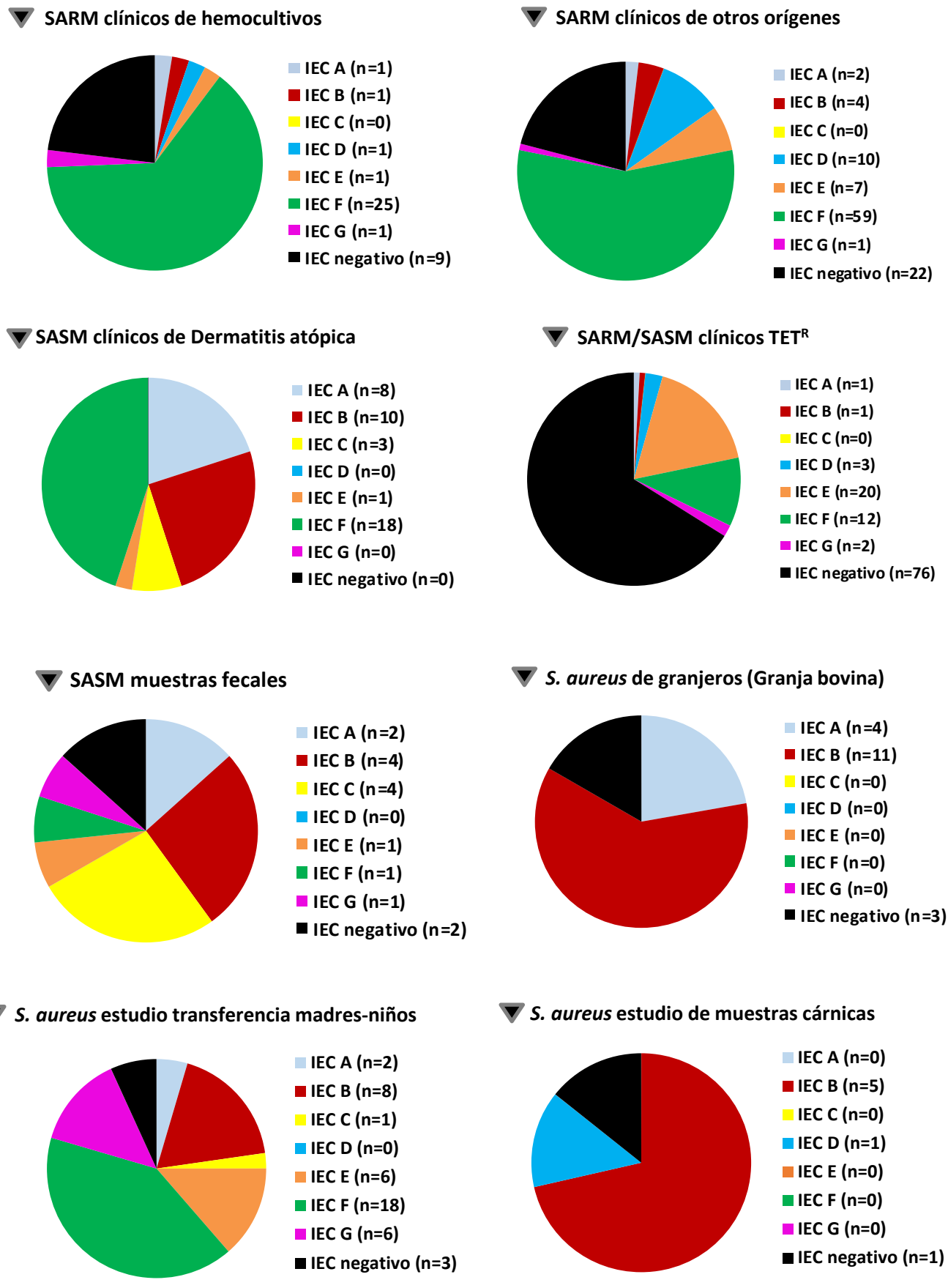


Figura 57. Proporción de los tipos IEC en relación el origen de las cepas de *S. aureus* analizadas en esta tesis

6.2. Tipos IEC detectados en relación a las líneas genéticas de las cepas *S. aureus* y a su fenotipo de resistencia a meticilina

Para realizar este análisis seleccionamos 350 cepas del total de 392 cepas de *S. aureus* de esta tesis, representando el 89,3% del total. Los complejos clonales incluidos fueron (nº de cepas): CC1 (22), CC5 (154), CC8 (13), CC30 (51), CC45 (17), CC228 (13) y CC398 (80), (**Figura 58**).

Respecto al CC1, el IEC mayoritariamente encontrado entre las cepas de esta línea genética fue el IEC tipo E (95%) entre las cepas resistentes a meticilina, mientras que el único tipo A encontrado fue en una cepa SASM. No se detectaron cepas IEC-negativas, ni ninguna cepa que presentara el resto de tipos IEC.

En relación al CC5, en el 75,3% de las cepas analizadas se detectó el IEC tipo F, no encontrándose una diferencia entre las cepas SARM y SASM. En proporciones mucho menores se detectaron otros tipos de IEC, como el tipo A (1,9%), tipo B (0,6%), tipo E (4,5%) o tipo G (1,3%). En un 16,2% de las cepas no se detectó ninguno de los tipos de este sistema de genes. Los tipos C y D no fueron detectados entre esta línea genética.

Aunque el número total de cepas analizado para el CC8 es menor, encontramos mayor variabilidad, siendo el IEC tipo B el mayoritario (53,8%), sobre todo entre las cepas SARM. Los tipos D, E y F fueron detectados tanto entre cepas SARM como SASM en proporciones mucho menores, entre el 7-15%. Tan sólo en un 15% de estas cepas no se detectó ningún tipo IEC.

Respecto a las cepas adscritas al CC30, se evidenció una gran variabilidad, detectándose todos los tipos IEC excepto el tipo C. La proporción, aunque con dominancia de los tipos A y B (66,6%), fue la siguiente: tipo A (25,5%), tipo B (41,2%), tipo D (3,9%), tipo E (13,7%), tipo F (1,9%) y tipo G (1,9%). La mitad de las cepas que presentaron el IEC tipo B fueron tipadas como SARM. En un 11,8% no se detectó ningún tipo IEC.

En el caso de las cepas pertenencientes a la línea CC45, se detectó el tipo IEC B como el más prevalente (64,7%), seguido de lejos por el tipo F (23,5%) y el D (5,9%).El resto de tipos no fueron detectados. En un 5,9% de las cepas no se detectó ningún subtipo de este sistema.

En relación con las cepas del CC228, en todas las cepas donde se detectó IEC resultaron pertenecer al tipo D (84,6%), mientras que en el resto no se encontró ningún tipo IEC (15,4%).

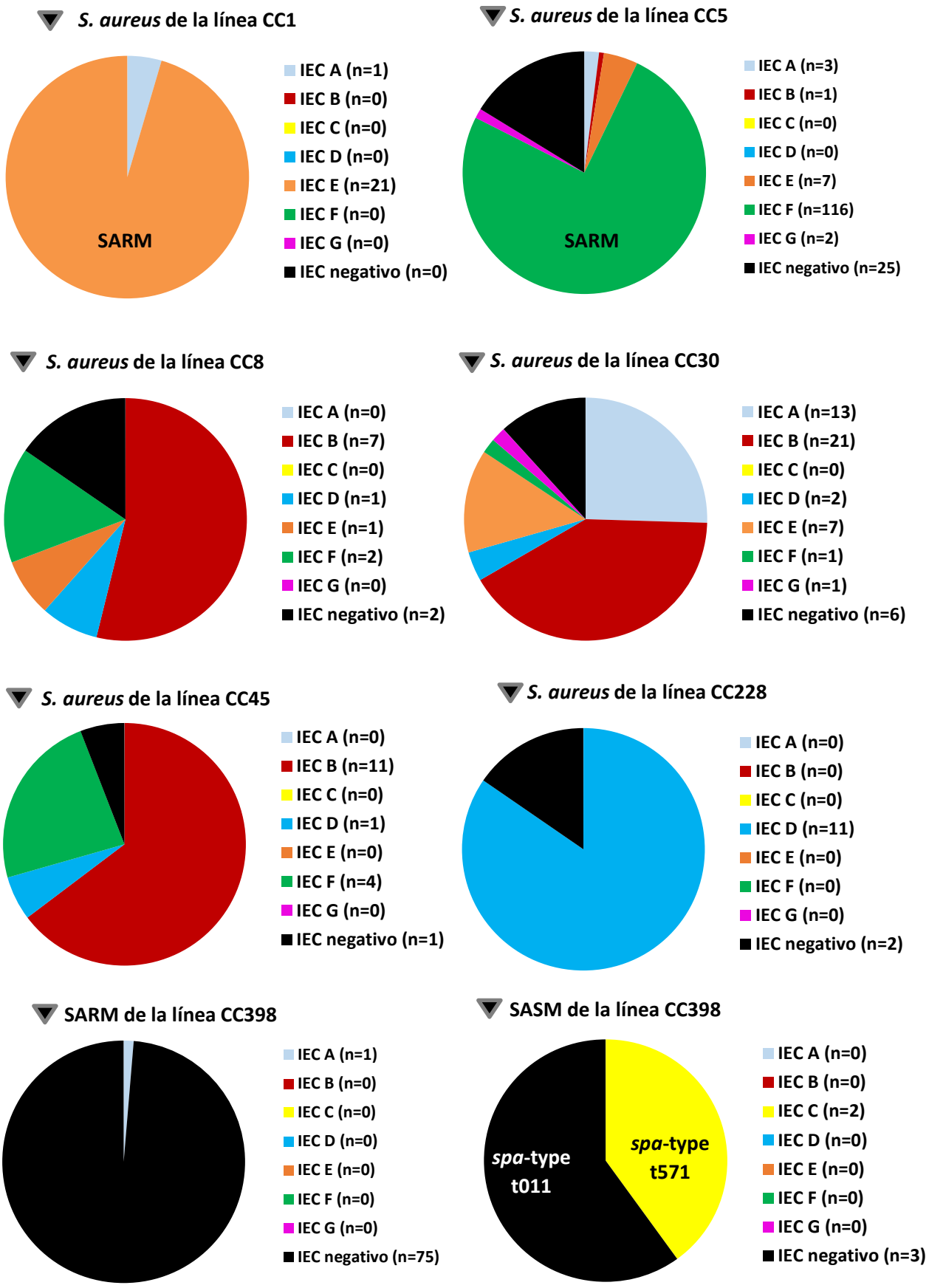


Figura 58. Proporción de los tipos IEC en relación a las líneas genéticas mayoritarias detectadas en esta tesis.

Es entre las cepas adscritas al CC398 donde encontramos más diferencias, siendo negativas para cualquier variante del sistema todas las cepas SARM-ST398/CC398 (96,2%), presentando la mayor parte el *spa*-type t011. Tan sólo una de las cepas con las características anteriores presentó el IEC tipo A, perteneciente a una de las cepas aisladas en uno de los casos clínicos de antiguos granjeros. En el caso de las cepas SASM-ST398/CC398 con *spa*-type t571, todas presentaron el IEC tipo C (2,5%), mientras que las SASM-ST398/CC398 con *spa*-type t011 seguían careciendo del sistema IEC.

Cabe destacar que en otras líneas genéticas minoritarias de esta tesis, como las correspondientes a los complejos clonales CC130 y CC133, resultaron ser negativas a cualquier variante del sistema IEC, lo que apuntó claramente hacía un origen animal.

Finalmente, en la **figura 59** se analiza la presencia o ausencia de IEC respecto al diferente genotipo de resistencia a meticilina entre las líneas genéticas mayoritarias. Se observa que la mayor concentración de cepas IEC negativas la encontramos entre los aislados SARM de los complejos clonales CC5, CC8, CC45, CC228 y especialmente en CC398, mientras que tan sólo encontramos cepas SASM IEC negativas entre los aislados pertenencientes al CC30.

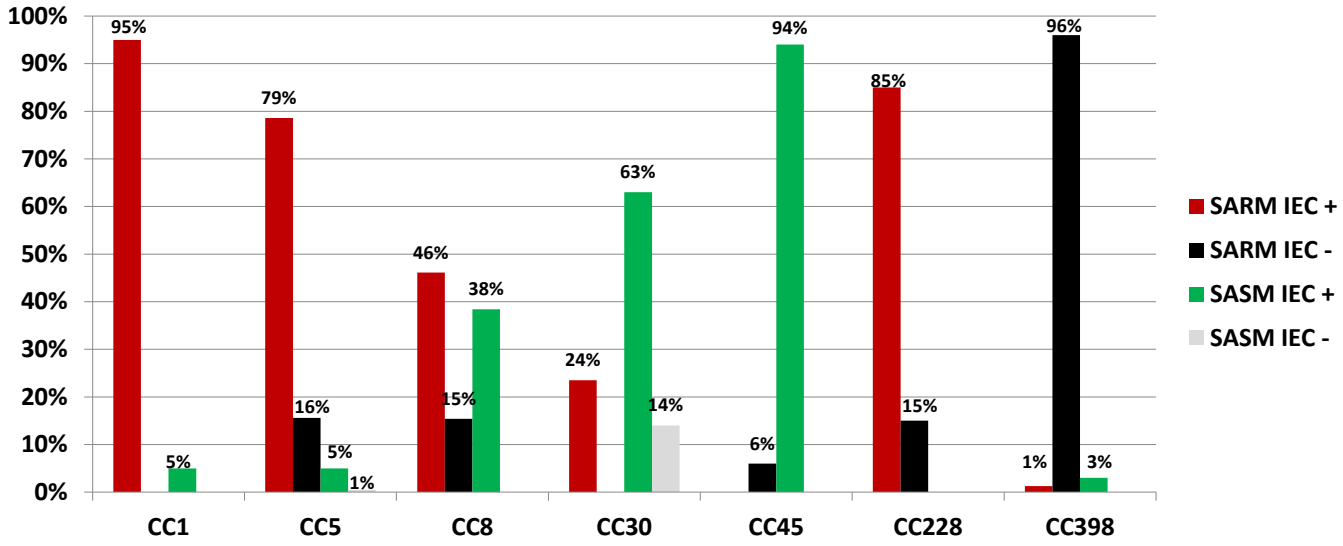


Figura 59. Proporción de cepas IEC positivas o negativas en *S. aureus* respecto de los complejos clonales mayoritarios y en función de su genotipo de resistencia a meticilina.

7. VIRULENCIA DE *S. aureus* DE DIFERENTES LÍNEAS GENÉTICAS EN EL MODELO ANIMAL DE PATOGENÍA *C. elegans*.

Tras la caracterización molecular y la determinación de el contenido en fagos (EGMs) de una selección de cepas, se estudió la patogenicidad de cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes y líneas genéticas, usando para ello el modelo animal de *C. elegans.* Dichos experimentos se realizaron gracias a una estancia en el laboratorio del Dr. Alfonso Navas y con la colaboración de la Dra. Susana C. Arcos, del Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (laboratorio de referencia nacional para el estudio de nematodos, adscrito al CSIC). Se testaron 15 cepas *S. aureus* seleccionadas entre las estudiadas en esta tesis y alguna adicional de la colección de la Universidad de La Rioja. Las características moleculares de las cepas, así como los resultados en cuanto al test de patogenía en *C. elegans* se muestran en la **tabla 56**, donde se puede ver la tasa de muerte supervivencia en *C. elegans* (alta, intermedia-alta, intermedia-baja y baja)**.** La respuesta patogénica en *C. elegans* recogida en esta clasificación se presenta de forma simplificada en la **figura 60**, donde podemos ver el efecto general que algunas de las cepas testadas ejercían sobre la supervivencia del nematodo, desde el punto de vista de la supervivencia de los individuos testados y su reducción a lo largo del tiempo del estudio (24-120 h).

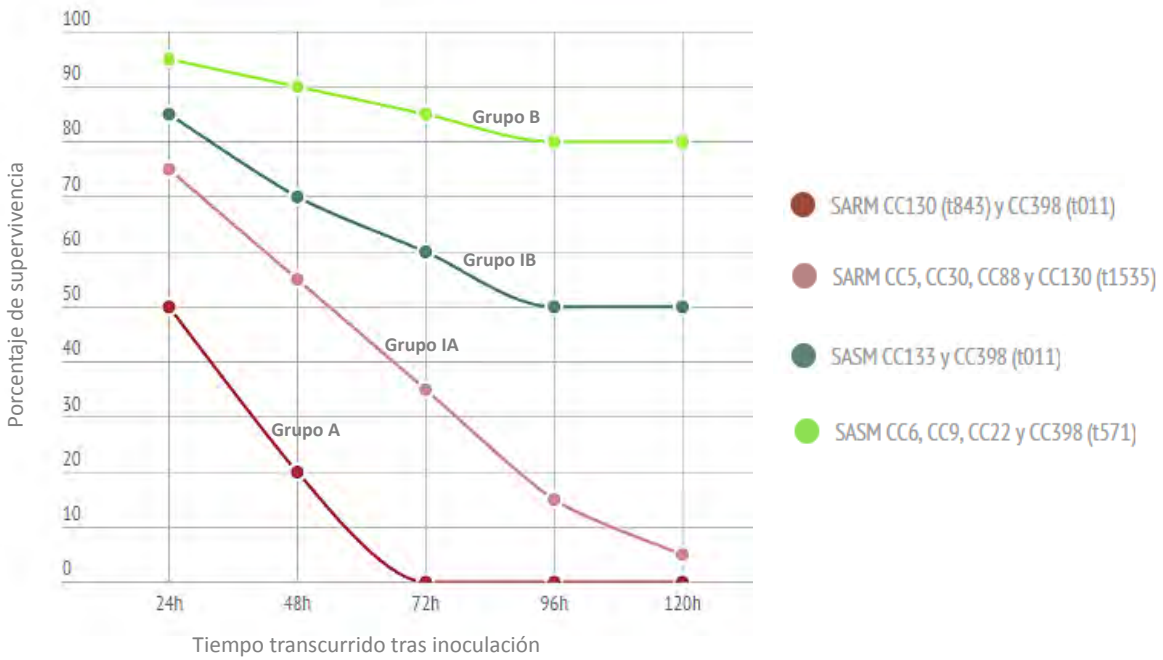


Figura 60. Representación simplificada (media de los porcentajes) de la supervivencia observada en cada uno de los grupos anteriormente citados (A, IA, IB, B)

Se observó un claro gradiente de mortalidad en las cepas analizadas, en el que las variables más determinantes fueron la presencia de la resistencia a meticilina y/o presencia de alguno de los tipos SCC*mec* (fundamentalmente los tipos IV, V y XI), y el perfil fágico de las cepas estudiadas, como se muestra en la **figura 61**, donde se analizaron estadísticamente los resultados de una manera multivariante descriptiva (Análisis Factorial de Correspondencias).

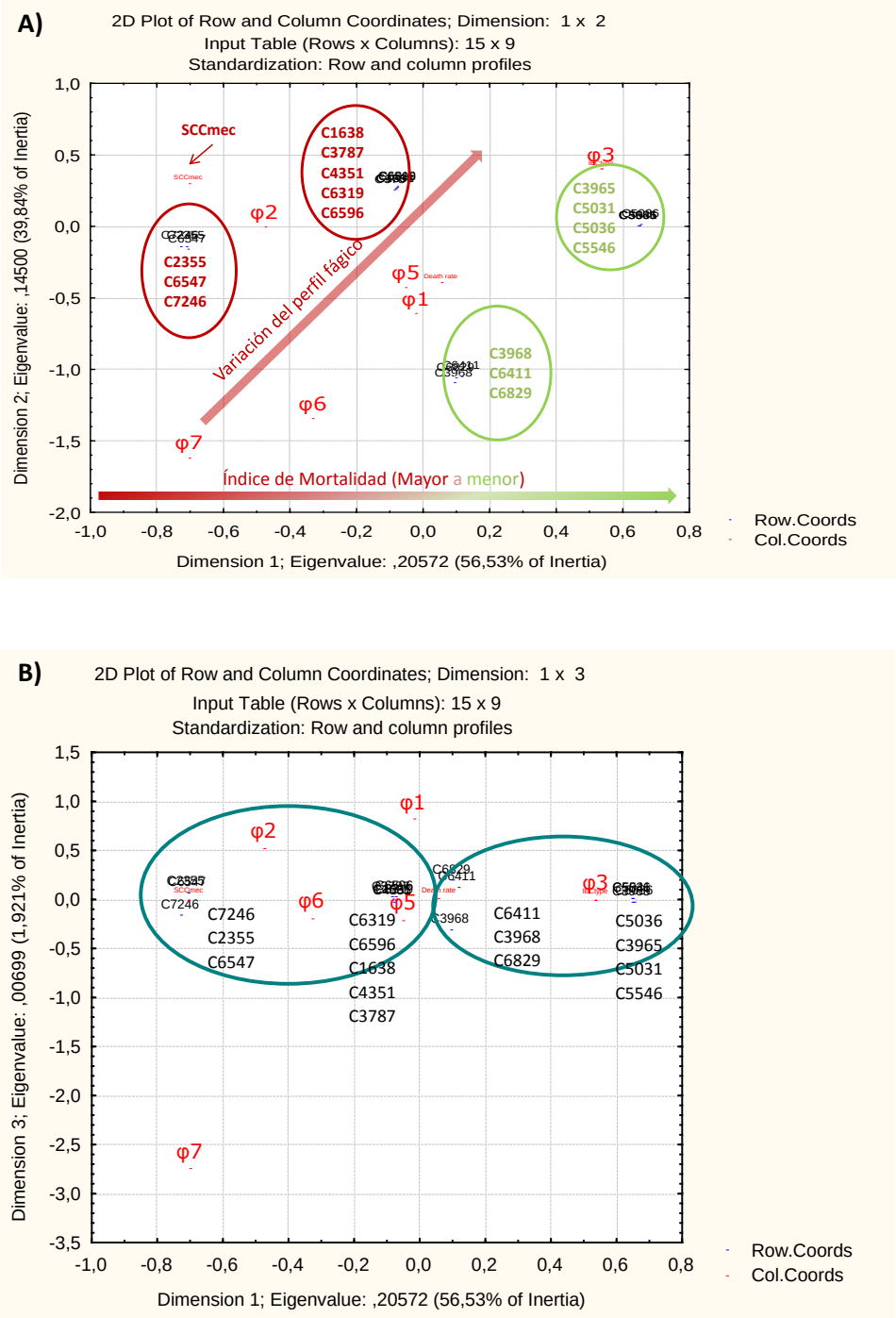


Figura 61. Análisis de los datos obtenidos mediante Análisis Factorial de Correspondencias (Statistica v. 6.0). Disposición de las variables en el espacio factorial definido. A) según los ejes 1-2; B) según los ejes 1-3

La variación detectada se produce fundamentalemnte en el plano definido por los ejes 1 y 2 que son factores que representan respectivamente la variación de la mortalidad y del "perfil fágico" (ambos explican el 95,37% de la variabilidad total, **Figura 61A).** El eje 3 representa muy poca variabilidad del conjunto (1,921%, **Figura 61B**).

De esta manera, se observó una mayor relación entre las cepas SARM que portaban SCC*mec* y un perfil fágico asociado a la familia Saϕ2 (familia de fagos que contienen fundamentalemnte la leucotoxina de Panton-Valentine) con un perfil patogénico más elevado (cepas con tasas altas o muy altas de muerte). Aunque no en todas estas cepas se detectó dicha toxina. Estas cepas correspondían a las líneas genéticas pertenencientes a los complejos clonales CC5, CC30, CC88, CC130 y CC398.

En el caso de las cepas CC5 y CC88, pertenecían al estudio de cepas clínicas aisladas en bacteriemias, la cepa SARM-CC30 testada era una de las caracterizadas en el caso de forunculosis recurrente descrito en esta tesis. Las 2 cepas SARM-CC130 eran las pertenecientes a la nueva línea emergente caracterizada por contener el nuevo determinante de resistencia a meticilina *mec*(C), integrado en un nuevo SCC*mec*, descrito como tipo XI. A su vez estas cepas contenían el gen codificante de la exfoliatina *etD2*. Se observó una mayor patogenicidad en *C. elegans* en la cepa SARM-CC130 de origen humano que en su homóloga de origen animal (Gómez et al., 2014). Asimismo, en el grupo de nivel patogénico más elevado se detectaron 2 cepas SARM-CC398, una de ellas procedente de un caso de empiema pulmonar letal aislado en un paciente (Lozano et al., 2011) y la otra de una de las cepas aisladas en muestras nasales de cerdos del caso clínico, asociado con la resistencia a tetraciclina.

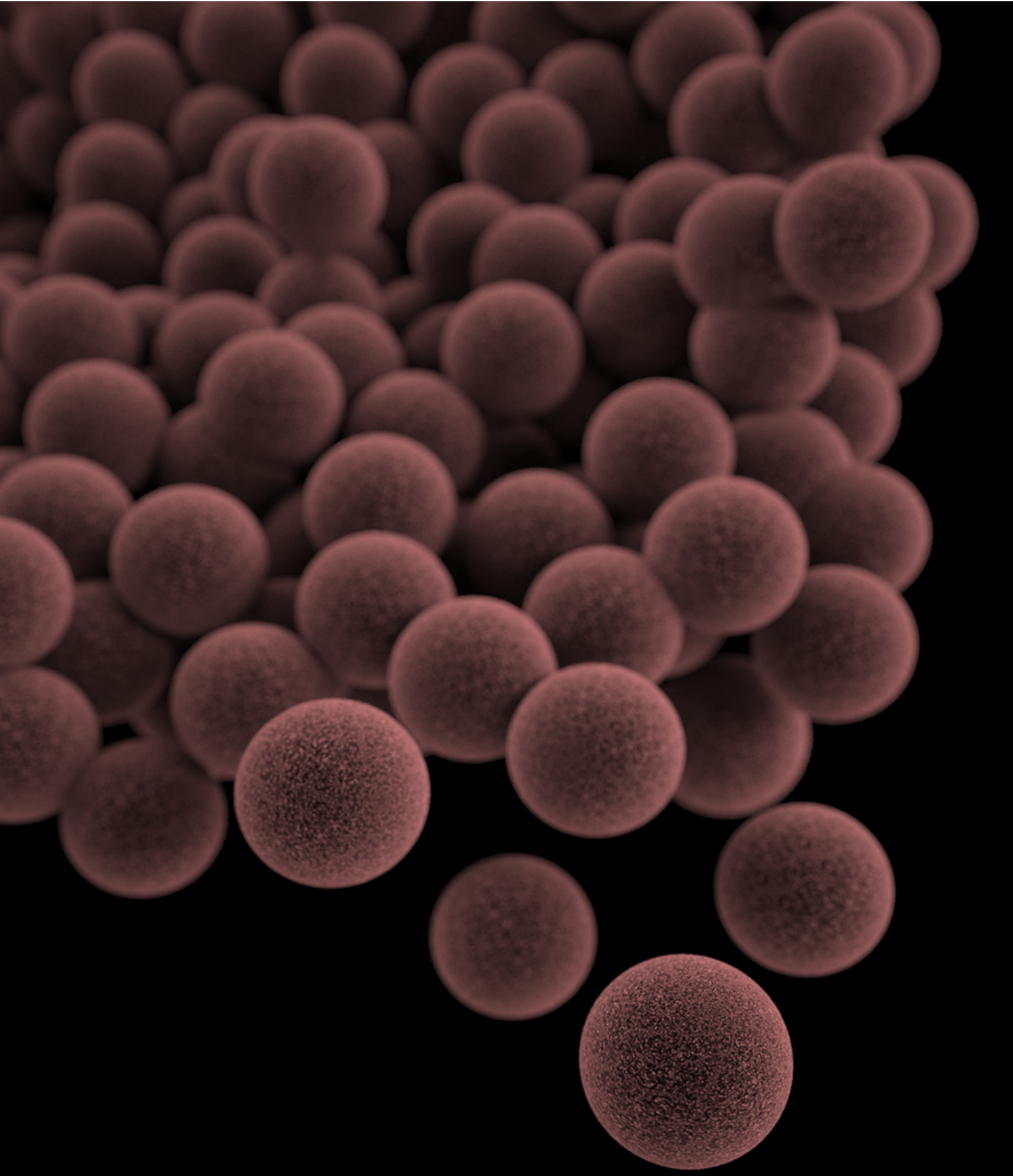
Por otro lado, el resto de cepas testadas no presentaban ningún tipo de SCC*mec* (cepas SASM) y entre las partículas fágicas detectadas con mayor prevalencia figuraba la de la familia Saϕ3. También es cierto que algunas cepas, aunque no todas, presentaban diferentes combinaciones de genes de toxinas estafilocócicas como los de la exfoliatina A (*eta*) y de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*), pero no parecieron estar relacionadas con la patogenía en *C. elegans*, observándose entre ellas niveles bajos o medios de mortalidad del nematodo. Estas cepas SASM correspondían a los complejos clonales CC6, CC9, CC22 y CC398.

Cabe destacar que entre este grupo de cepas se encontraban aislados pertenecientes al CC398, pero en este caso eran cepas SASM, con un contenido en genes de virulencia que se limitaba al gen codificante de la proteína de unión al colágeno (*cna*) y que normalmente portaban fagos de la familia Saϕ3.

Tabla 56. Características moleculares y resultado de virulencia de las 15 cepas de*S. aureus* testadas en el modelo patogénico animal *de C. elegans*

Cepa	SARM/ SASM	Origen[a]	Tipado Molecular				Perfil fágico (Integrasa)[b]							Factores de virulencia		Modelo *C. elegans*
			spa-type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC	ϕ1	ϕ2	ϕ3	ϕ5	ϕ6	ϕ7		IEC[c]	Otros genes	Tasa de muerte
C1638	SARM	IHH	t1490	III	IV	ST88/CC88	-	+	+	+	-	-	-	G	*pvl*	IA
C2355	SARM	IHH	t011	I	V	ST398/CC398	+	+	-	+	-	-	-	-	*cna*	A
C3787	SARM	IIH	t7892	II	IV	ST125/CC5	+	+	+	+	-	-	-	A	*pvl, luk-DE*	IA
C3965	SASM	PH	t571	I	-	ST398/CC398	-	-	+	+	-	-	-	C	-	B
C3968	SASM	PH	t3495	I	-	ST133/CC133	-	-	-	+	+	+	-	-	*tsst-1,luk-DE, luk-M*	IB
C4351	SARM	IIH	t067	II	IV	ST5/CC5	-	+	+	+	+	-	-	F	*tsst-1*	IA
C5031	SASM	LHDA	t209	II	-	ST109/CC9	+	-	+	+	-	-	-	F	*tsst-1, luk-DE, cna, eta*	B
C5036	SASM	LHDA	t2932	I	-	ST22/CC22	-	-	+	-	-	-	-	F	*tsst-1, luk-DE, cna*	B
C5546	SASM	LHDA	t304	I	-	ST6/CC6	+	-	+	+	-	-	-	A	*luk-DE, cna, eta*	B
C6319	SARM	IHH	t021	III	IV	ST30/CC30	-	+	+	-	-	-	-	B	*pvl, cna*	IA
C6411	SASM	PH	t011	I	-	ST398/CC398	+	-	-	+	-	-	-	-	*cna*	IB
C6547	SARM	PA	t011	I	V	ST398/CC398	+	+	-	+	+	-	-	-	*cna*	A
C6596	SARM	PA	t1535	III	XI	ST1945/CC130	+	+	+	-	-	-	-	E	*etd2*	IA
C6829	SASM	PH	t011	I	-	ST398/CC398	+	+	-	-	+	-	-	-	*cna*	IB
C7246	SARM	IHH	t843	III	XI	ST130/CC130	-	-	-	+	-	+	-	-	*etd2*	A

[a]Origen: IHH, infecciones en heridas humanas; IIH, infecciones invasivas humanas; PH, portador humano; LHDA, lesion humana de dermatitis atópica; PA, portador animal
[b]Las celdas sombreadas indican la detección de cada integrase de cada fago
[c]IEC tipo A (*scn, chp, sak, sea*); IEC tipo B (*scn, chp, sak*); IEC tipo C (*scn, chp*); IEC tipo E (*scn, sak*); IEC tipo F (*scn, chp, sak, sep*); IEC tipo G (*scn, sak, sep*).
[d]Tasa de muerte: A, alta; IA, intermedia-alta; IB, intermedia-baja; B, baja



Discusión

“Ciencia es aquello sobre lo cual cabe siempre discusión”

José Ortega y Gasset (Filósofo)

Los diferentes estudios genéticos y epidemiológicos que se han llevado a cabo a lo largo de esta tesis doctoral han tenido como principal objetivo el intentar describir las líneas genéticas predominantes de *S. aureus* en cada uno de los distintos orígenes definidos e intentar establecer la estructura poblacional de este microorganismo en diferentes ámbitos antropoecológicos y definir los factores de riesgo asociados a su colonización y/o infección en humanos. Asímismo, la completa caracterización molecular de las 392 cepas incluidas en este trabajo, ha permitido conocer los distintos patrones de resistencia a antimicrobianos y las habilidades colonizadoras e invasivas de los tres grandes grupos de *S. aureus* conocidos: *S. aureus* asociado a ámbitos clínicos y hospitalarios (AH), *S. aureus* asociado a ámbitos comunitarios (AC) y *S. aureus* asociado a animales de producción o ganado (AG). El estudio del clúster de genes de evasión del sistema inmune humano (IEC) nos ha permitido disponer de una nueva herramienta epidemiológica para tratar de discernir los límites de éstos 3 grandes grupos. Por último, se ha abierto una nueva línea de investigación aplicada "in vivo" en la que la utilización de modelos animales, como el nematodo *C. elegans,* ha resultado ser de gran interés para disponer de datos acerca de los posibles factores que se pueden asociar con mayor o menor capacidad patogénica de *S. aureus* en dicho modelo animal.

Caracterización de cepas SARM de origen hospitalario procedentes de diferentes orígenes.

Se llevó a cabo la caracterización molecular de 144 aislados SARM, de los cuales 39 pertenecieron a cepas procedentes de hemocultivos y 105 fueron aislados de otros orígenes. Se trató de investigar la prevalencia por SARM en cada uno de los orígenes establecidos y comprobar la existencia o no de diferencias a nivel molecular entre este tipo de aislados.

Aunque la prevalencia global por SARM en el estudio de aislados procedentes de hemocultivos en el hospital estudiado se fijó en el 35,1% (39 cepas SARM del total de 111 cepas *S. aureus*), se observó un aumento progresivo de la prevalencia por SARM si consideramos los 4 primeros años del estudio, con una progresión ascendente desde el 2007 (25%) hasta el 2010 (45%), disminuyendo en el último año del estudio, en 2011 (36%). Si observamos la evolución de la prevalencia en el conjunto de España se observa la misma progresión ascendente desde finales de los 80 hasta la primera década de los 2000 (2% a 30%) (Cuevas et al., 2008; Vindel et al., 2009). Si bien las tasas de nuestro estudio son más elevadas con respecto a las anteriores mencionadas, caen dentro de lo reflejado en los informes anuales EARSS, observándose prevalencias por SARM de carácter invasivo entre el 25-50% para el conjunto del país entre los años 2007-2010, con una clara disminución en 2011, con

prevalencias entre 10-25% (EARSS, 2007-2011), tendencia a la baja también constatada en el último año de nuestro estudio. Esta misma tendencia se está evidenciando en gran parte de los países europeos, especialmente en Reino Unido y Francia (prevalencia por SARM entre 10-25%). Sin embargo, esta situación es diferente en otros países del continente como Portugal, Italia, Grecia, Eslovaquia o Rumanía, donde las tasas todavía están en rangos entre el 25-50%, siendo incluso superiores en el caso de Rumania (EARSS, 2013). De este modo, se requiere la continuidad de las políticas de vigilancia activa y de contención del problema, por las implicaciones tanto en salud pública, como en términos económicos que tiene (Antoñanzas et al., 2015). La rápida detección y caracterización de SARM como agente etiológico de cuadros clínicos graves, es importante para una rápida elección del tratamiento adecuado (Gasch et al., 2013b; Gasch et al., 2014).

El clon mayoritariamente encontrado en los aislados SARM clínicos del Hospital RV-Z fue el CC5, con alta prevalencia tanto en hemocultivos (92,3%) como en otros orígenes (75,2%), algo que viene siendo habitual si lo comparamos con otros estudios realizados en diferentes hospitales españoles (Argudín et al., 2009; Velasco et al., 2012; Gasch et al., 2013a; Gasch et al., 2013b; González-Dominguez et al., 2015). Cabe destacar que la línea genética dominante entre este tipo de aislados clínicos fue t067-ST125/CC5-*agr*II, (66,7% en los de hemocultivos y 37,1% en los de otros orígenes), línea derivada del conocido como clon pediátrico (Aires de Sousa et al., 2004;Argudín et al., 2009), que parece haber relegado casi por completo a la línea genética ST247/CC5, denominada clon ibérico, considerada hegemónica en España entre los aislados clínicos durante la década de los 90 y principios de los años 2000 (Cuevas et al., 2008; Gasch et al., 2011). Estudios previos, además del nuestro, han demostrado la gran clonalidad de la línea t067-ST125/CC5, presentando una alta frecuencia de resistencia a ciprofloxacino, eritromicina y a un número variable de aminoglucósidos, especialmente a tobramicina y kanamicina. Estas resistencias suelen estar mediadas por mutaciones en *gyr*(A) y *grl*(A) y por los genes *ant*(4′)-Ia, *aph*(3´)-IIIa y *msr*(A), *msr*(B) o *mph*(C) (Pérez-Vázquez et al., 2009; González-Dominguez et al., 2015).A su vez, el gen de resistencia a meticilina, *mec*(A), se encuentra integrado dentro del SCC*mec* IV, siendo el subtipo IVc el más frecuentemente encontrado (Lozano et al., 2013). Es de destacar que aunque esta línea genética sea muy prevalente en los hospitales españoles, es poco frecuente en otros países europeos y del resto del mundo (Grundmann et al., 2010), con la excepción de Portugal (Aires de Sousa et al., 2008) y Finlandia (Vainio et al., 2011), donde pese a haber sido detectada, no alcanza la prevalencia española. Esta distribución tan regionalizada o local ya había sido constatada en estudios previos, donde se postula que los tipos *spa* de las cepas SARM

responden a patrones geográficos específicos, a diferencia de lo que ocurre con las cepas SASM, cuya variedad de tipos *spa* no parece ajustarse a asociaciones geográficas específicas (Grundmann et al., 2010).

Las cepas pertenecientes a la misma secuencia tipo que las anteriores (ST125) pero con una diversidad de tipos *spa* (fundamentalmente el t2220 y t2226), poseían características moleculares similares. Este tipo de cepas fue mayor entre los aislados clínicos de orígenes diferentes a hemocultivos, en concordancia con estudios recientes en nuestro país (González-Domínguez et al., 2015).

En general, todas las cepas pertenecientes a la línea genética ST125/CC5 respondían al perfil típico de SARM asociado a ambientes hospitalarios (SARM-AH) caracterizados por multirresistencia a antibióticos y un perfil de virulencia muy limitado a hemolisinas y leucocidina DE, como ya se indica en estudios previos (Chua et al., 2014). Esta línea genética ha sido también asociada a ambientes comunitarios (SARM-AC) en estudios recientes en nuestra zona geográfica (González-Domínguez et al., 2012). Cabe destacar que en tres de nuestras cepas (una de hemocultivos y dos de otros orígenes) se detectó el gen de virulencia *tsst-1*, nada habitual entre este tipo de aislados (Lozano et al., 2013). Asímismo, se detectaron otras tres cepas (una de hemocultivos y dos de otros orígenes) adscritas a la misma secuencia tipo pero con la particularidad de contener el gen de la leucotoxina de Panton Valentine (*pvl*), cepas en las que se detectó un nuevo *spa*-type, t7892, que no ha vuelto a identificarse hasta la fecha. Respecto al cluster de genes de evasión del sistema inmune humano (IEC), las cepas ST125/CC5 volvieron a presentar una gran clonalidad siendo tipadas la mayoría de ellas con el IEC tipo F, tipo que parece estar más ligado a infecciones asociadas a ámbitos hospitalarios. Aunque existe poca bibliografía al respecto, algunos autores han postulado una asociación entre el tipo de línea genética y el tipo de IEC mayoritario (McCarthy et al., 2012), en la que claramente la asociación entre las cepas ST125/CC5 y el tipo IEC F es un hecho. Una excepción a esta regla podríamos encontrarla en el caso de las 3 cepas t7892-ST125/CC5, que presentaron IEC A, algo que podría explicarse por la presencia de un perfil de virulencia propio (*pvl*+) y un fenotipo de resistencia que poco tiene que ver con el resto de cepas con su mismo ST.

Por otro lado, en un total de 15 cepas (5 procedentes de hemocultivos y 10 de otros orígenes) se detectó la línea genética ST5/CC5-*agr*II con SCC*mec* IV, línea asociada directamente con el clon pediátrico, uno de los 6 clones pandémicos más importantes descritos en clínica (Oliveira et al., 2002), que se detecta con cierta frecuencia en hospitales españoles (Lozano et al., 2013) y en gran medida en el resto del mundo (Aires de Sousa et al.,

2004). Estas cepas se caracterizaron por poseer numerosos determinantes de resistencia a aminoglucósidos, eritromicina y/o clindamicina principalmente. Esta misma línea genética ha sido asociada con numerosas infecciones en Francia, tanto en ambientes hospitalarios (SARM-AH) como comunitarios (SARM-AC), aunque con algunas características moleculares diferentes (Robert et al., 2011; Margat et al., 2013), que fue denominado "clon Geraldine". Entre este tipo de cepas existe algo más de variabilidad en cuanto al IEC predominante, ya que se detectan o el tipo F, E o ninguno de los tipos descritos. En este caso, también podría establecerse una relación clonal entre las cepas con *spa* t002 y el IEC E y en menor medida el IEC F.

Otra de las líneas detectadas entre los aislados clínicos es la tipada como t109-ST228/CC228-*agr*II-SCC*mec* I, que ha sido recientemente incluida por el algoritmo eBURST en el CC5, aunque algunos autores consideran que existe variabilidad entre ambos clones (Monecke et al., 2009). Esta cepa, aunque presente en otros estudios parecidos en nuestro país (González-Domínguez et al., 2015) y a pesar de estar considerada una línea genética muy ubicua, presente en diferentes países centroeuropeos (Albretch et al., 2011; Vogel et al., 2012), parece competir con otras líneas genéticas SARM-AH, existiendo evidencias de que podría estar siendo remplazada por la línea ST125/CC5-SCC*mec* IV en nuestro país (Menegotto et al., 2012) o en otros países europeos por los clones británicos ST36/CC30-SCC*mec* II (EMRSA-16) (Coque et al., 2010) o ST22/CC22-SCC*mec* IV (EMRSA-15) (Baldan et al., 2015), este último también detectado en bajo número entre nuestras cepas clínicas. En el caso de las cepas ST228/CC228, presentan algunas características propias en nuestro estudio, con una alta resistencia a mupirocina mediada por el gen *mup*(A) o la presencia del gen de la exfoliatina A (*eta*) en una de ellas, nada habitual si lo comparamos con otros estudios (Gasch et al., 2013), además de presentar un frecuente perfil de resistencia a macrólidos, lincosaminas y aminoglucósidos. La mayor parte de estas cepas las encontramos en frotis de control epidemiológico y en menor medida, en bacteriemias. La alta detección de esta línea genética entre aislados clínicos en localizaciones nasales (20%), podría estar relacionada con la alta tasa de resistencia a mupirocina que posee, dado que es el tratamiento de elección para la descolonización nasal de *S. aureus* en nuestro país (Lozano et al., 2011). Estas cepas fueron adscritas en todos los casos al IEC tipo D.

No menos importante es la detección de una cepa tipada como t1490-ST88/CC88-*agr*III-*pvl*+ con SCC*mec* IVd entre los aislados procedentes de hemocultivos y de seis cepas asociadas al ST8/CC8-*agr*I con SCC*mec* IV entre los aislados clínicos de diferentes orígenes, algunas de ellas también portando el gen *pvl*. Estas cepas se han asociado con un perfil de

SARM asociado a la comunidad (SARM-AC), que suelen aparecer en infecciones que principalmente afectan a la piel, mucosas y otros tejidos blandos, y con menor incidencia, también pueden ser responsables de algunos casos relacionados con bacteriemias y otras patologías de carácter necrosante (Lo et al., 2009; Mediavilla et al., 2012). En el caso de la cepa asociada al CC88, es infrecuente en Europa, aunque existen algunos casos en España (Aspiroz et al., 2010; Vindel et al., 2014) y otros casos puntuales en otros países europeos como Italia, Portugal, Bélgica, Inglaterra, Austria o Suiza (Denis et al., 2005; Monecke et al., 2007; Aires de Sousa et al., 2008; Fang et al., 2008; Krziwanek et al., 2011; Wettstein Rosenkranz et al., 2014); en general son cepas que se asocian frecuentemente con infecciones en piel y tejidos blandos por SARM-AC en países asiáticos (Udo et al., 2010; Li et al., 2012) y africanos (Moremi et al., 2012). En el caso de las cepas pertenecientes al CC8, clon pandémico en EEUU denominado como USA300, se ha determinado como el clon más prevalente en infecciones por SARM-AC en Europa (Vandenesch et al., 2003; Deurenberg et al., 2009), aunque también se cree que pueda estar desplazando a las líneas típicas SARM-AH de los entornos hospitalarios (David et al., 2010; Campanile et al., 2012), lo que podría apoyar su detección en nuestro estudio. En general, son cepas que se caracterizan por tener bajos perfiles de resistencia a antibióticos, aparte de β-lactámicos, y por contener el gen de la leucotoxina de Panton-Valentine (*pvl*) (Chambers et al., 2009; Chua et al., 2014); sin embargo, en EEUU también se han encontrado cepas con resistencia a macrólidos, clindamicina y tetraciclina (Tenover et al., 2009). Curiosamente entre las seis cepas CC8 detectadas entre nuestros aislados clínicos, cinco de ellas carecían del gen *pvl* y mostraban resistencia tan sólo a algunos aminoglucósidos, por lo que pensamos que pudieran tratarse de clones híbridos europeos o que han perdido parte de sus determinantes típicos. La otra cepa, tipada como t5173-ST8/CC8, fue la única que presentó el gen *pvl* y resistencia a macrólidos, lincosaminas y tetraciclinas, lo que nos hace suponer que se acerca más al clon estadounidense, aunque la misma línea genética fue detectada en otro estudio de nuestro grupo en España (Gómez-Sanz et al., 2013). Respecto al IEC y en contraposición con las anteriores cepas, el IEC predominante entre las cepas CC8 es el tipo B, al igual que la cepa CC88, que presenta IEC tipo G, algo que podría explicarse por el diferente perfil molecular mostrado, propio de cepas SARM-AC.

Es interesante remarcar la detección de la cepa SARM t4235-ST152/CC152-*pvl*+ en una lesión de piel de un paciente, ya que este clon, hasta hace poco se había detectado exclusivamente en infecciones comunitarias y hospitalarias de África (Ugolotti et al., 2011; Shittu et al., 2012; Egyr et al., 2014; Conceiçao et al., 2014), tratándose en un principio de un clon sensible a la meticilina (SASM) pero que al mismo tiempo que iba diseminándose por todo

el mundo, con casos detectados en el Caribe (Rosenthal et al., 2014) y en Europa (Perez-Roth et al., 2010; Katopodis et al., 2010) fue siendo detectado en su forma resistente a meticilina (SARM). Como indicaba Ruimy et al., 2008, este clon pudo adquirir resistencia a este antimicrobiano en su salto al viejo continente debido a los altos flujos migratorios. Actualmente este clon se encuentra de forma minoritaria en Europa formando parte de las listas de patógenos comunitarios y podemos encontrarlo tanto en su forma SASM como SARM, evidenciando su continua evolución genética (Pérez-Roth et al., 2010; Brauner et al., 2013). De nuevo, el tipo IEC G fue el determinado para esta cepa, al igual que la anterior CC88, con la que comparte la presencia del gen de la toxina *pvl*, misma característica que las cepas CC5-*pvl*+ tipadas con IEC A. Lo que nos hace pensar que este cluster, además de estar ligado a la línea genética, puede ser indicativo de un perfil de virulencia característico que dista, por ser más significativo clínicamente, de las cepas tipadas con IEC F o B.

Finalmente se detectaron otras líneas genéticas minoritarias entre las cepas clínicas de diferente origen, tres de ellas asociadas a la línea ST398/CC398 (*spa*-types t011 o t108), línea tradicionalmente ligada a SARM asociada a animales (SARM-AG), especialmente cerdos (Wulf et al., 2008; Gómez-Sanz et al., 2010), pero que en los últimos años está experimentando una gran diseminación en numerosos ámbitos y ecosistemas (Graveland *et al*., 2010; Longaric et al., 2014), como veremos más adelante. Cabe resaltar que todas las cepas adscritas a esta secuencia tipo, ST398, fueron negativas para el IEC, lo que nos sugiere un posible origen animal, dada la línea y dado el resultado negativo de este marcador. Asímismo, fueron detectadas otras dos cepas pertenecientes a la línea genética ST1/CC1, que se encuentra de forma pandémica entre las infecciones por SARM-AC en EEUU, bajo la denominación de clon USA 400 (Jones et al., 2014). En general, el CC1 se ha encontrado como agente etiológico de infecciones graves en humanos (Otter et al., 2008), pero también ha aparecido asociado a animales (Battisti et al., 2010), de hecho algunos autores creen en el posible salto del animal al hombre (Franco et al., 2011), con la particularidad de que las cepas que proceden del clon humano contendrían el gen *sak*, incluido en el tipo IEC E, tipo que fue detectado en nuestras cepas y que nos permite sugerir un origen humano.

Perfiles moleculares de cepas *S. aureus* relacionadas con procesos clínicos cutáneos. Forunculosis recurrente y dermatitis atópica.

Los procesos dérmicos infectivos, tanto los más leves como los más graves, son asociados con frecuencia a infecciones producidas por *S. aureus*, ya sea en su forma SASM o SARM (Naimi et al., 2003; Bieber et al., 2008), aunque los más graves o recurrentes, como es el caso de las forunculosis, suelen ser mayormente relacionados con SARM asociados al entorno

comunitario (SARM-AC) (Demos et al., 2012). Por otro lado, existen estudios que correlacionan una alta colonización por *S. aureus* en aquellos pacientes diagnosticados con dermatitis atópica, que a su vez presentan una estructura poblacional diferente al de individuos sanos (Guzic et al., 2005; Gomes et al., 2011), ya que aunque no se tenga claro los mecanismos patogénicos por los cuales el *S. aureus* está implicado en estos procesos, sí que se ha sugerido el carácter exacerbante que este microorganismo pudiera tener en la enfermedad (Lebon et al., 2009; Gomes et al., 2011).

El caso clínico del clon SARM-CC30-*pvl*+. Procedencia y ubicuidad.

En el caso de la forunculosis recurrente familiar, la línea genética detectada fue la tipada como SARM t021-ST30/CC30-*agr*III con SCC*mec* IV, siendo *pvl*+. Esta línea genética ha sido considerada como el clon pandémico SARM-AC más distribuido por todo el mundo (De Leo et al., 2010), causante de múltiples y variadas infecciones de gravedad en Sudamérica (Rozembaum et al., 2009; Gelatti et al., 2013; López-Furst et al., 2013), Asia o Oceanía (Song et al., 2011; Ko et al., 2013; Yamaguchi et al., 2015), de donde parece estar su origen. En Europa la prevalencia es menor, pero también ha sido detectada (Shore et al., 2014) y en el caso concreto de España, aunque se estima que la prevalencia por SARM-AC es baja, en torno al 1-2%, (Otter et al., 2010) y está asociada más a cepas CC8 y CC80 (Manzur et al., 2008; Coque et al., 2010), también se han dado varios casos por este mismo clon (Rivero-Pérez et al., 2012; Vindel et al., 2014).

El perfil de resistencia mostrado por el clón implicado (ciprofloxacino, eritromicina y trimetoprim-sulfametoxazol) era acorde con otros estudios previos (Shore et al., 2013). Aunque no muy frecuentes, no debemos infravalorar la aparición de este tipo de clon que a menudo emerge como brotes epidémicos fuera de sus países de origen (Wiesse-Posselt et al., 2007; Ali et al., 2012) y que suele estar ligado a la dispersión por flujos migratorios desde países asiáticos u Oceanía, especialmente Filipinas, Nueva Zelanda y Australia (Shore et al., 2013). Estos mismos cambios en la estructura poblacional por SARM-AC también los sufren estos mismos países del pacifico occidental donde se ha visto que el clon SARM-CC30-*pvl*+ está siendo desplazado por líneas genéticas más prevalentes en Europa, EEUU o Japón, como el clon MRSA-CC5-*pvl*- (Williamson et al., 2013), pandémico en España.

El IEC determinado en las cepas ST30-*pvl*+ fue el B, y como hemos apuntado antes, podría relacionarse con cepas más abundantes en ambientes comunitarios, lo que encajaría en su claro perfil SARM-AC.

Dermatitis atópica. Importancia en la colonización/infección. Líneas genéticas.

El estudio se llevó a cabo sobre una población pediátrica de niños con diferentes grados de severidad de dermatitis atópica, ya que según datos que aportan otros estudios, esta enfermedad afecta con mayor prevalencia a niños (5-30%) que a adultos (2-10%) (Bieber et al., 2008; Yeung et al., 2011).

Todas las cepas aisladas en este estudio resultaron ser SASM, no habiéndose detectado cepas SARM, algo que viene siendo habitual en los procesos relacionados con la dermatitis atópica, tanto en nuestra área geográfica (Rojo et al., 2014), como en otros países como Portugal, Canadá, Reino Unido y China, donde además, caso de haberse detectado cepas SARM, han estado ligadas con perfiles genéticos asociados a la comunidad (SARM-AC) o asociados al ámbito hospitalario (SARM-AH) (Wu et al., 2010a; Yeung et al., 2011; Balma-Mena et al., 2011; Conceiçao et al., 2011). En cualquier caso, estudios previos han demostrado que no existe una susceptibilidad mayor entre aquellos pacientes con dermatitis atópica y los individuos sanos para ser colonizados o infectados por SARM (Huang et al., 2009; Matiz et al., 2011). Lo que si se ha constatado es la mayor facilidad que tienen los pacientes con dermatitis atópica para ser colonizados por SASM, una vez que la enfermedad ha dañado la integridad de las barreras de la piel, disminuyendo así la respuesta inmunitaria y defensiva frente a patógenos (Balma-Mena et al., 2011). Por ello, no hay que menospreciar la ausencia de resistencia a meticilina entre este tipo de cepas, ya que algunos autores han sugerido la posibilidad de que los clones SARM han podido derivar de los mismos clones SASM, que en un momento u otro adquirieron el SCC*mec*, así como algunas de las características asociadas al casete cromosómico, mostrando un perfil clínico muy parecido (Wu et al., 2010a; Argudín et al., 2013).

Además de una gran diversidad clonal, con 16 líneas genéticas diferentes encontradas, se observaron diferencias importantes en la estructura poblacional entre las cepas procedentes de localizaciones cutáneas y las de origen nasal. Diferencias que se evidenciaron respecto a los perfiles de resistencia y virulencia encontrados, siendo siempre más frecuentes en cepas de origen cutáneo. La detección en 5 de los pacientes de las mismas líneas genéticas (CC5 y CC30), en ambas localizaciones, pone de manifiesto la importancia de la colonización nasal por *S. aureus* como origen o reservorio para una posterior colonización de la piel y/o infección por este microorganismo, como algunos autores han sugerido (Yeung et al., 2011; Balma-Mena et al., 2011; Rojo et al., 2014) y que además puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad durante la niñez o la adolescencia (Lebon et al., 2009).

De acuerdo con los índices de gravedad de la enfermedad, determinado mediante el SCORAD entre los pacientes con detección de *S. aureus* de origen cutáneo, parece que los clones CC5 (clon pediátrico ya detectado en esta tesis) y CC45, se asocian más con un estadio severo de dermatitis. Estos clones se asocian con perfiles ligados a ambientes hospitalarios (Chua et al., 2014), siendo el SASM-CC45 considerado como uno de los clones colonizadores de seres humanos más extendidos en el mundo (Melles et al., 2008) pero también implicados en procesos infectivos, tanto en su variante SARM siendo considerado en algunos casos como SARM-AC (Seidl et al., 2015), como en su variante SASM asociada a fibrosis quísticas y bacteriemias en el ámbito hospitalario (Rasmussen et al., 2014; Masoud-Lagraf et al., 2015), ambas variantes detectadas con frecuencia en Europa. Curiosamente, ambos tipos de cepas fueron tipados como IEC tipo F, lo que podría apoyar en este caso su perfil hospitalario.

Otra de las cepas asociadas en este estudio a cuadros severos de DA y encontrada en una muestra cutánea, es la tipada como t571-ST398/CC398. Aunque se trate de un complejo clonal tradicionalmente asociado a animales, en este caso se refiere a la línea genética asociada a humanos (SASM-t571-CC398), línea que de hecho ha sido considerada altamente transmisible entre humanos y que ha sido detectada tanto formando parte de la microbiota normal de humanos (Lozano et al., 2011, David et al., 2013) o como patógeno en diversas infecciones (Vandendriessche et al., 2011; Price et al., 2012). Las bases moleculares para definirla como “humana” se basan, por un lado en la detección de IEC, cuya presencia se asocia a poblaciones de *S. aureus* presentes en humanos (Uhlemann et al., 2012), y por otra la detección del gen *erm*(T), de resistencia a tetraciclina, que ha sido postulado como marcador humano en este tipo de cepas (Price et al., 2012). Hay estudios que van más allá y que hipotetizan acerca de la posibilidad de que esta línea SASM-CC398 (asociada a humanos), sea la precursora en origen de la actual línea SARM-CC398 asociada con animales, mayormente con cerdos (Price et al., 2012).

Del mismo modo, otras cepas cuyo origen animal o humano ha sido puesto en duda tradicionalmente, son las tipadas como t127-ST1/CC1 (aislada de muestra cutánea) y t267-ST97/CC97 (aislada de muestra nasal), ambas detectadas en el grupo de pacientes con SCORAD moderado. En el caso de la cepa CC1, presentaba el marcador molecular de origen humano, con la detección del IEC tipo A, conformado entre otros por el gen *sak,* que como hemos visto en el capítulo anterior se asocia más con el clon humano (Franco et al., 2011). En el caso de la cepa CC97, ha sido detectada tanto en su forma SARM como SASM, y a su vez tanto en cerdos (asociada a SASM/SARM-AG) como en infecciones clínicas humanas (SASM/SARM-AH) (Armand-Lefevre et al., 2005; Sung et al., 2008; Gómez-Sanz et al., 2010; Menegotto et al.,

2012; Köck et al., 2013). Recientemente también ha estado implicada como agente causante de intoxicaciones alimentarias (Sobral et al., 2012; Boost et al., 2013a,b). La gran ubicuidad demostrada por esta línea genética, considerada como de amplio espectro de huésped, hace difícil el seguimiento de su origen, pero su detección en estudios epidemiológicos anteriores en nuestra área (Lozano et al., 2011; Argudin et al., 2013), la ausencia de un fenotipo de resistencia destacado y la presencia del IEC nos permite apuntar hacia un probable origen humano de la cepa de nuestro estudio.

Cabe destacar la detección de varias cepas pertenecientes a los complejos CC8 y CC80, mayormente en muestras cutáneas de pacientes con SCORAD moderado y que habitualmente han sido ligadas a líneas genéticas comunitarias (SARM-AC) (Conceiçao et al., 2011; Uhlemann et al., 2014). En nuestro caso, estas cepas carecen del perfil típico de virulencia (gen *pvl*) definido para SARM-AC Europeo (Chambers et al., 2009; Chua et al., 2014), así como de los perfiles de resistencia a macrólidos, lincosaminas y tetraciclinas definidos para el clon USA 300 (Tenover et al., 2009), ambos incluidos en el CC8. Todos ellos presentaron IEC tipo B o F, lo que de nuevo podría sugerir un híbrido sensible a meticilina.

Otras líneas genéticas detectadas entre los aislados procedentes de muestras cutáneas de pacientes con DA fueron CC6, CC7, CC9, CC10, algunas de ellas relacionadas con colonizaciones asintomáticas (CC6) (Schaumburg *et al*., 2011) o de causa clínica (Kechrid *et al*., 2011), otras detectadas entre poblaciones de niños en estudios con similares características (CC7 y CC10) (Ho et al., 2012; Gu et al., 2015) e incluso algunas asociadas a clones altamente prevalentes en cerdos de China (CC9) (Cui et al., 2009). En todos estos clones se detectó alguno de los tipos de IEC, por lo que su origen más probable sería el humano. Todas estas cepas fueron aisladas en pacientes con SCORADs severos o moderados, lo que podría ser indicativo de una implicación en la enfermedad más allá de ser simples colonizadores.

La detección del SASM-CC30 en un 50% de las cepas de origen nasal y en un 11,5% de las cepas de origen cutáneo podría ser reflejo del papel principalmente colonizador que este clon pudiera tener en este estudio, hipótesis apoyada por otros autores que consideran al SASM-CC30 como uno de los clones más adaptados al ser humano y que se encuentra presente de manera frecuente formando parte de la microbiota normal en el ser humano (Argudín et al., 2013); algo que podría asociarse con la alta detección de la proteína de unión al colágeno (codificada por el gen *cna*), que presentaban este tipo de aislados y que a buen seguro tendrá algo que ver en la colonización y establecimiento de este clon en el ser humano. No hay que olvidar que otros estudios asocian este clon con un perfil más próximo a infecciones comunitarias, pero en el que la resistencia a meticilina suele ser una constante

(SARM-AC) (Van Belkum et al., 2009; Deurenberg et al., 2009). Ejemplo de ello es el caso de forunculosis por SARM-CC30 explicado con anterioridad en esta tesis. Algo que si encaja con un perfil clínico típico de cepas comunitarias es que el 90% de éstas cepas contenían el gen *tsst-1,* proporción mucho mayor que la encontrada entre las cepas CC30 procedentes de un estudio epidemiológico llevado a cabo por nuestro grupo (Lozano et al., 2011). Elevado perfil de virulencia que contrasta con un perfil bajo de resistencia a antibióticos, en la mayoría de los casos incluyendo sólo a penicilina, que ya se ha sido indicado en estudios previos como característica de clones comunitarios (Chambers et al., 2009).

La elevada prevalencia del gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst-1*) entre las cepas CC30, además de entre una gran parte de las demás cepas aisladas de ambas localizaciones, podría deberse al carácter exacerbante del cuadro clínico de dermatitis atópica que parecen tener las toxinas pirógenas superantígeno (PTSAg) entre las que se encuentra la TSST (Lee et al., 2013). Asímismo, algunas de las enterotoxinas estafilocócicas, especialmente la A, B y C podrían también estar implicadas en una complicación de la enfermedad, genes que hemos detectado entre nuestros aislados. En general, todas las cepas tipadas con IEC A (CC1, CC6, CC15 y algunas de las cepas CC30) tienen integrado el gen *sea* de la enterotoxina A en su genoma, mientras que el de la enterotoxina B (gen *seb*) fue detectado en una cepa CC59, linaje normalmente asociado a infecciones comunitarias en nuestro país (Vindel et al., 2014). Por último, dos de las cepas CC45 presentaron el gen de la enterotoxina C (*sec*), línea genética frecuentemente asociada a la producción de este tipo de toxina (Yeung et al., 2011). La mayor parte de las cepas que contenían cualquiera de estos llamados “exacerbantes” procedían de pacientes con SCORAD severo o moderado, lo que pone de manifiesto la posible implicación de *S. aureus* en la enfermedad.

Cabe destacar que todas las cepas fueron positivas para alguno de los tipos de IEC, siendo mayoritarios el F, A y B, lo que nos indica una variedad genética entre estas cepas próximas a perfiles tanto comunitarios (SASM-AC) como hospitalarios (SASM-AH). A su vez, que todas las cepas fueran determinadas como IEC positivas implica que todas ellas poseen el gen *scn*, gen relacionado con la inactivación de la cascada del sistema del complemento humano, lo que favorece la disminución de las primeras barreras del sistema inmune innato humano, facilitando así la colonización y/o infección por *S. aureus*. De hecho, estudios previos, relacionan la presencia y expresión de este gen con la severidad del proceso de DA (Rojo et al., 2014).

Por último, respecto a los perfiles de resistencia detectados, fueron mayores entre las cepas cutáneas que entre las cepas de origen nasal, excepto para la meticilina y el ácido

fusídico. Las diferencias fueron más evidentes en la resistencia a macrólidos, aminoglucósidos y lincosaminas, rangos que en cualquier caso se encontraban en valores intermedios comparados con otros estudios de similares características en los que los valores de resistencia a eritromicina estaban entre el 15-50% o del 10-25% en el caso de la gentamicina (Wu et al., 2010a; Hill et al., 2011; Tang et al., 2011). Estos valores podrían deberse al amplio uso de los macrólidos como primera línea terapéutica en aquellos pacientes pediátricos alérgicos a la penicilina, o en el caso de la gentamicina debido a su uso en terapias conjuntas con corticoesteroides (Petry et al., 2012). Por otro lado, la alta prevalencia de resistencia a mupirocina detectada (19,2%) entre las cepas de origen cutáneo, muy por encima de las tasas obtenidas en estudios previos (Tang et al., 2011), pudiera ser debido al elevado uso de este antibiótico como tratamiento de elección en lesiones cutáneas por *S. aureus*. De hecho, en pacientes diagnosticados con cuadros severos o moderados de DA y signos clínicos de infecciones secundarias, se recomiendan baños con lejía reducida junto con un tratamiento basado en la mupirocina para reducir la severidad de la enfermedad (Eichenfield et al., 2014). Las tasas de resistencia a ácido fusídico, próximas al 4% en nuestro estudio, podrían estar relacionadas con el uso de este antibiótico en ciertas afecciones, como es el caso del impétigo (Hill et al., 2011; Petry et al., 2012).

Perfil genético de cepas clínicas SARM-TET^{R}. ¿Existe asociación entre clones SARM-AG y el contacto con animales? El caso del clon CC398.

En los anteriores estudios expuestos hasta ahora en esta tesis hemos visto la aparición de cepas de procedencia clínica pertenecientes a líneas genéticas cuyo origen humano o animal se ha puesto en entredicho. Se trata de líneas genéticas fundamentalmente asociadas a los clones CC1 y CC398 que en cada caso han sido clasificadas con uno u otro origen en base a sus características moleculares. Un rasgo particular que se ha evidenciado en estos clones es la resistencia a tetraciclina, especialmente en aquellas cepas que además presentaban resistencia a meticilina (SARM-TET^{R}). La resistencia a tetraciclina se ha postulado como un buen marcador molecular para la detección rápida de cepas pertenecientes a líneas genéticas de origen animal, especialmente para el clon CC398 (Lozano et al., 2012; Camoez et al., 2013). El extensivo uso de oxitetraciclinas en veterinaria podría estar detrás del elevado número de cepas SARM-TET^{R} relacionadas con ganado (SARM-AG) (Wulf et al., 2008). Basándonos en ésta evidencia, realizamos la caracterización molecular de todas las cepas SARM-TET^{R} recogidas entre los años 2011-2012 en el hospital UMS-Z, tanto las cepas de control epidemiológico como las de significancia clínica, lo que representó un 13,1% del total de cepas SARM detectadas en el citado hospital en el período estudiado. A su vez, el clon

CC398 fue detectado en el 7,9% del total de las 749 cepas SARM aisladas durante el período, prevalencia ligeramente superior a la encontrada en otro estudio previo realizado por nuestro grupo en el mismo hospital pero en el periodo 2009-2010 (5,2%) (Lozano et al., 2012). Cabe destacar que en ambos estudios no se tuvieron en cuenta las cepas SARM-TET^{S}, por lo que la proporción de cepas CC398 podría ser aún mayor en el caso de que existieran cepas SARM CC398 sensibles a tetraciclina, hecho que es improbable. En cualquier caso la tendencia al alza de este tipo de clon también ha sido observada en otros hospitales de España o Alemania (Camoez et al., 2013; Köck et al., 2013), con prevalencias que rondan el 20% por CC398 del total de cepas SARM-TET^{R} analizadas, prevalencia claramente superior en nuestro estudio, donde las cepas tipadas como CC398 alcanzó el 60% del total de las cepas SARM TET^{R}. La elevada tasa por CC398 detectada en nuestro estudio podría estar relacionada con el hecho de que el área geográfica muestreada presenta una elevada densidad de explotaciones porcinas con gran actividad laboral en este sector.

Fue por esta razón por la que decidimos realizar un estudio paralelo llevando a cabo una encuesta epidemiológica sobre el posible contacto con animales de granja en todos los pacientes cuyas cepas habían sido incluidas en éste estudio, tratando de establecer una posible asociación entre el contacto animal, como factor de riesgo, y la detección de cepas CC398. En este sentido, se establecieron 3 grupos de pacientes: A) con contacto con animales de granja; B) sin contacto con animales de granja; C) sin datos respecto al contacto con animales de granja. Se observó que el clon CC398 era dominante en los 3 grupos de pacientes, pero era significativamente superior ($p<0,005$) entre aquellos pacientes que referían contacto con animales de granja (76%) (grupo A), que entre aquellos pacientes que negaron el contacto (50%); resultados que eran igualmente significativos si tan sólo considerábamos las cepas con significancia clínica (75% vs 46%). Sin embargo, también debemos destacar la alta prevalencia por SARM CC398 entre las cepas del grupo B (sin contacto animal), ya que estos elevados valores pueden ser explicados considerando el potencial de transmisibilidad entre humanos que este tipo de clon ha demostrado tener, y que ha sido constatado previamente, ya sea mediante estudios de transmisión intrahospitalaria (Wassenberg et al., 2011; Hetem et al., 2013; Deiters et al., 2015), como por estudios de transmisión comunitaria o intrafamiliar (Verkade et al., 2014). No obstante, estos estudios han apuntado que aunque la transmisión humano-humano por SARM-CC398 es posible y de hecho ya han comenzado a aparecer en brotes epidémicos (Verkade et al., 2012), no es mayor que la de otros clones SARM o la de su clon homólogo pero sensible a meticilina, que parece caracterizarse por su facilidad para colonizar al hombre como su nicho ecológico natural, cuyo máximo representante ha sido

tipado como SASM-t571-CC398 (McCarthy et al., 2012; Price et al., 2012; David et al., 2013). Las características propias de este clon, más asociado a humanos, reside en presentar de manera invariable el tipo *spa* t571 asociado con la sensibilidad a meticilina (David et al., 2013), presentar frecuentemente un fenotipo de resistencia asociado a macrólidos y lincosaminas codificado por el gen *erm*(T) integrado en plásmidos (Gómez-Sanz et al., 2013) y contener los genes del IEC, especialmente el gen *scn*, cuya detección es obligatoria para la consideración de cualquier tipo de IEC.

Todas las cepas SARM ST398 portaban el gen *mec*(A). A su vez todas las cepas sin excepción carecían del gen *scn*, por lo que resultaron ser IEC negativas, apoyando la hipótesis de que se trataban de la variante animal del clon CC398 (Uhlemann et al., 2012). La mayoría de estas cepas (47 cepas/79,6%) también presentaron un fenotipo multirresistente a otras 3 familias de antibióticos (macrólidos, lincosaminas y quinolonas), además de a la meticilina, lo que concuerda con estudios previos en nuestro país (Lozano et al., 2012) y en otros países europeos (Vanderhaeghen et al., 2010a), lo que limita en gran medida las opciones terapéuticas (Cuny et al., 2013). Aunque la resistencia a quinolonas en este tipo de cepas ha sido considerada menos habitual (Cuny et al., 2013), más de la mitad de nuestras cepas presentaban esta resistencia, al igual que en el caso de los macrólidos. Estas resistencias, junto a la tetraciclina, han sido clasificadas por la OMS de importancia crítica en la medicina humana, por lo que se aconseja un uso más moderado tanto en ámbitos clínicos humanos como en veterinaria (Collington et al., 2009). Se observaron diferentes genes codificantes de la resistencia a tetraciclina, entre los que destacó el gen *tet*(M) como el más prevalente en esta serie de cepas, lo que viene siendo habitual en otros estudios similares (Argudin et al., 2011; Feβler et al., 2011; McCarthy et al., 2012). Asimismo se obtuvieron cepas con fenotipo de resistencia a macrólidos-lincosaminas (M^R-L^R), mediado mayormente por el gen *erm*(C), siendo este fenotipo común en este tipo de cepas (Cuny et al., 2013); por otro lado se observó un número reducido de cepas con resistencia M^S-L^R disociada (sensibilidad a macrólidos y resistencia a lincosaminas), siendo responsables los genes *lnu*(A) y *vga*(A). Algunos autores han postulado que este fenotipo M-L disociado podría ser indicativo de un origen animal para este tipo de cepas CC398 (Lozano et al., 2012). También se detectaron otros determinantes de resistencia para el fenotipo asociado M^S-L^R, como los genes *erm*(A), *erm*(B) que no son nada frecuentes entre cepas SARM-CC398 (Argudín et al., 2011). A su vez, se detectaron porcentajes de resistencia entre el 2-8% a otros antibióticos, como la gentamicina, tobramicina, mupirocina y ácido fusídico, destacando la alta infrecuencia con la que éstos fenotipos han sido detectados en esta línea genética (Chua et al., 2011), siendo en esta tesis donde se confirma el primer

reporte a nivel mundial de una cepa SARM-CC398 con el gen *fus*(C), evidenciando la gran habilidad de esta línea genética para captar nuevos y variados determinantes de resistencia a antibióticos, postulándose así como un posible reservorio de este tipo de genes (Kadlec et al., 2012).

En general, el perfil de virulencia de las 59 cepas SARM-CC398 fue muy escaso, encontrándose diferentes combinaciones de hemolisinas en la que la más prevalente fue la hemolisina gamma (*hlG*), conocida por su actividad hemolítica (Kaneko et al., 2004). Destaca la detección en el 67,8% del gen *cna*, codificante de la proteína de unión al colágeno, proteína que favorece la adhesión de la cepa a diferentes tejidos del hospedador (Zetola et al., 2005) y que ha sido detectada en altas proporciones en estudios anteriores en nuestra área (Lozano et al., 2012). No se detectaron ninguna de las demás toxinas estudiadas, incluida la LPV, y es que es común la ausencia de este tipo de genes entre las cepas CC398, comparadas con otras líneas genéticas (Lozano et al., 2012). No obstante, ya han comenzado a reportarse casos de cepas CC398-*pvl*+ en otras zonas del mundo (Williamson et al., 2014; Koyama et al., 2015), evidenciando de nuevo el carácter variable de estas cepas.

Respecto a este carácter genético variable, se encontraron 7 *spa*-types diferentes entre las cepas adscritas a la secuencia tipo ST398, siendo mayoritario el *spa* t011, representando el 74,5% del total de cepas CC398. Este tipo *spa* fue el primero que se detectó entre las cepas CC398 (Witte *et al*., 2007, van Belkum *et al*., 2008) y aunque fue mayormente asociado a cerdos, cada vez fueron apareciendo más nichos ecológicos, como caballos, vacas y pollos, donde el *spa* t011 fue detectado (Nemati *et al*., 2008; Cuny *et al*., 2008; Graveland *et al*., 2010;Van den Eede *et al*., 2009; Gómez-Sanz et al., 2014), al igual que la línea t1255-CC398, también detectada en este estudio. Por otro lado, otros *spa*-types asociados a CC398 fueron detectados en menor número, como el t1451/t1456 o t1197, que aunque menos frecuentes también han sido relacionados con ganado equino (Witte *et al*., 2007; Van den Eede *et al*., 2009). Por otra parte, también se detectó el *spa* t899-CC398, que se ha asociado recientemente con aves de corral en algunos países europeos (Krupa et al., 2014), con cerdos en China (Yan et al., 2014) o como colonizador en humanos (Monaco et al., 2013). Por último se detectó también el *spa* t1606, detectado también en otros países europeos en ambientes hospitalarios (Köck et al., 2013).

Otras líneas genéticas fueron detectadas en este estudio, destacando la línea ST1/CC1 que fue detectada en el 20% de los pacientes con contacto animal y en el 21% de los pacientes sin contacto animal. Esta línea genética parece tener un amplio rango de hospedadores (Cuny et al., 2013), habiéndose encontrado tanto en ambientes hospitalarios

(Monaco et al., 2013) como agente etiológico de infecciones graves (Layer *et al*., 2006; Otter *et al*., 2008), e incluso se han dado casos de brotes epidémicos (David et al., 2010). Asímismo, se ha detectado en diferentes animales de granja (Franco et al., 2011), como vacas (Pilla et al., 2012), caballos (Cuny et al., 2008) o cerdos (Battisti et al., 2010), evidenciándose en todos los casos una probable transmisión desde el animal al hombre. Como vemos, ocurre algo similar que con los clones CC398 y se cree en la existencia de 2 variantes, una más asociada a humanos e infecciones hospitalarias y otra cuyo origen podría estar en animales. En este caso no estarían tan claros los límites entre una u otra variante genética y la resistencia a meticilina no parece ser un factor determinante para decantar la balanza, por lo que tan sólo nos queda el marcador IEC, al que fueron positivas todas las cepas detectadas de esta línea genética, concretamente con el IEC tipo E. Este tipo de IEC contiene el gen *sak*, que como hemos visto en capítulos anteriores ha sido considerado como un marcador de la variante humana (Franco et al., 2011). Las cepas CC1 detectadas en nuestro estudio, destacaron por presentar altas tasas de resistencia a macrólidos y lincosaminas, mediadas fundamentalmente por el gen *erm*(C), aunque también fue detectado el gen *erm*(A), genes que habitualmente se encuentran en esta línea genética (Franco et al., 2011). Más infrecuente todavía es la detección en dos de estas cepas del gen *vga*(A), que como veíamos con anterioridad en el clon CC398, suele ser un marcador de origen animal, ocasionando un fenotipo disociado M^S-L^R. Hasta la fecha no se conoce la relación que este gen pueda tener con el origen de la cepa, ya que se trata del primer estudio donde se ha detectado. El perfil de virulencia de estas cepas resulta similar al del otro clon mayoritario, diferenciándose por albergar el gen *hlGv* (hemolisina gamma variante) y el gen *luk-DE*, resultados similares han sido detectados en estudios anteriores (Lozano et al., 2012). La variabilidad genética de la línea t127-CC1 y la capacidad de adaptación a diferentes hospedadores la convierten en otra de las líneas genéticas cuyo seguimiento se hace necesario.

La última de las líneas genéticas más numerosamente encontradas entre las cepas SARM-TET^R fue la asociada al CC5, línea que como hemos visto en esta tesis, es muy prevalente en hospitales españoles (Lozano et al., 2013), y que como en nuestro estudio, suelen tener asociada, casi de manera invariable, la resistencia a ciprofloxacino, tobramicina, kanamicina y eritromicina. Lo que es menos común es que presente resistencia a tetraciclina o que contenga genes de resistencia a macrólidos y lincosaminas del tipo *erm*(B) o *lnu*(A), rasgo que ha aparecido entre nuestras cepas procedentes de bacteriemias u otros orígenes clínicos. Por tanto podríamos pensar que las cepas SARM-CC5-TET^R podrían contener una variabilidad genética mayor que las SARM-CC5-TET^S. La mayoría presentaron IEC F pero también fue

detectado el tipo E y G, demostrando que esta línea genética se encuetra diseminada en diferentes formas clonales en diferentes ambientes.

Por último, otros complejos clonales fueron detectados de manera minoritaria, como el CC6, CC8, CC25, CC45, CC59, destacando la detección del CC188 que previamente ha sido reportado en casos de bacteriemias humanas o contaminaciones alimentarias (He et al., 2013; Song et al., 2015), en muestras de mastitis de camellos (Monecke et al., 2011), o en infecciones asociadas a SARM-AC (Ghaznavi-Rad *et al*., 2010; O'Brien *et al*., 2009).

En resumen y a la vista de nuestros resultados podríamos concluir que el contacto con animales de granja constituye un factor de riesgo para la colonización o infección por SARM-CC398 con las repercusiones sanitarias que puede conllevar, impresiones compartidas en otros estudios (Garcia-Graells et al., 2012). Sin embargo, también fue detectada la línea ST398 entre las cepas SARM-TET^{R} de pacientes sin contacto con animales de granja, lo cual pone de manifiesto la posible diseminación humano-humano.

Dinámica de colonización por *S. aureus* CC398. Evolución genética en portadores de larga duración.

Una vez determinada la alta frecuencia de detección de cepas ST398 entre los aislados clínicos SARM-TET^{R}, la siguiente cuestión era conocer la capacidad de persistencia en la microbiota nasal de estos aislados ST398. Para el análisis de este tema podemos usar los datos aportados por algunos casos clínicos analizados en esta tesis, en los que se detectó cepas ST398 en antiguos granjeros o personas con alto grado de contacto con animales de granja en el pasado.

El paciente guía perteneciente al caso clínico 1, exgranjero de granja de cerdos y que en la actualidad ayudaba a su hijo en la granja, resultó tener una colonización asintomática por una cepa t011-CC398. Esta cepa era SASM y no portaba el gen *mec*(A), algo que no es nada habitual entre cepas CC398 con *spa*-type t011, ya que normalmente esta línea genética, denominada SARM-AG (MRSA-LA en inglés) se caracteriza por contener habitualmente este gen de resistencia a meticilina integrado dentro de algún tipo de SCC*mec*, especialmente el tipo V (Lozano et al., 2012; Jamrozy et al., 2012; Chlebowicz et al., 2013; Christiansen et al., 2014). Como hemos dicho antes, este CC se asocia fundamentalmente a animales (cerdos) pero también a ámbitos humanos, especialmente en aquellas actividades relacionadas con la explotación porcina (Vandendriessche et al., 2013) y en áreas geográficas con gran densidad de granjas de cerdos (Monaco et al., 2013), en el que el contacto con este tipo de animales ha sido postulado como factor de riesgo en esta tesis. Aunque la cepa difería en el aspecto de la

meticilina con la del clon SARM-CC398, compartía la mayor parte de las características moleculares que habitualmente se detectan entre este tipo de cepas, como es un fenotipo de multirresistencia a antibióticos (tetraciclina, tobramicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina y clindamicina), entre el que se destaca la resistencia a clindamicina disociada de la eritromicina, codificado por el gen *lnu*(A) y *vga*(A), cuya presencia se asocia más con el clado de origen animal (Mendes et al., 2011; Lozano et al., 2012). Algunos autores han sugerido que este perfil multirresistente entre las cepas SASM-CC398 puede ser debido a que este tipo de cepas aprovechan el espacio genético dejado o no ocupado por el SCC*mec* para adquirir una larga batería de genes de resistencia (Vandendriessche et al., 2014), como podría ser en nuestro caso.

Esta inusual cepa SASM-t011-CC398, carente de cualquier determinante de resistencia a meticilina, se aisló precisamente de un antiguo granjero de cerdos, que en la actualidad seguía ayudando a su hijo en la granja, lo que podría asociar directamente su origen con estos animales. De hecho estudios previos, aunque escasos, han detectado cepas similares entre los cerdos de diversas granjas (Hasman et al., 2010). En otros estudios hacen hincapié en que la comprobada inestabilidad del SCC*mec* en las cepas SARM bajo ciertas condiciones podría ser causa de la delección parcial o completa de este casete genómico (Donnio et al., 2007; Noto et al., 2006; Shore et al., 2008; Chlebowicz et al., 2010; Wong et al., 2010) y que no se descarta que las cepas SASM-t011-CC398 podrían ser precursoras o derivadas de sus homólogas SARM, encontrándose en algunas cepas SASM partes incompletas o remanentes del SCC*mec* V que habitualmente se encuentran en las SARM (Vandendriessche et al., 2014).

A raíz de los interesantes resultados decidimos realizar el estudio epidemiológico sobre los convivientes del paciente guía, además de realizar un muestreo de los cerdos de la granja en la que trabajaba. Sin embargo no volvimos a detectar la cepa SASM-t011-CC398. No obstante la presencia de cepas SARM-CC398 tanto en la familia conviviente como en los cerdos de la granja fue remarcable, ya que tras el estudio filogenético por PFGE, descubrimos que las cepas tipadas como SARM t1451-CC398 o t899-CC398 detectadas en ambos orígenes, presentaban el mismo patrón electroforético, de lo que se podía deducir una más que posible transferencia horizontal de estas cepas, desde los cerdos hasta los humanos. Transferencia, que por otra parte, ya ha sido igualmente constatada por recientes estudios (van Cleef et al., 2013; Verkade et al., 2014; Vandendriessche et al., 2014). No fue así para las cepas SARM/SASM-t011-C398, que presentaron un patrón electroforético diferente, evidenciando la importancia que el casete cromosómico pudiera tener, no sólo en la resistencia a meticilina, sino para otros determinantes de interés. Un ejemplo de ello es la ausencia del gen *tet*(K)

entre las cepas SASM-t011 y su detección en las cepas SARM-t011, gen que se conoce por estar habitualmente integrado en el SCC*mec* V en las cepas de la línea CC398 de cualquier origen, cuya ausencia en nuestra cepa nos hace pensar en la escisión total de este casete cromosómico. Al contrario de lo detectado por otros autores entre cepas de la variante SASM-t011-CC398, donde algunos de los componentes del casete cromosómico permanecían de manera remanente, entre ellos el gen *tet*(K) (Vandendriessche et al., 2014).

Algo similar ocurría con las cepas procedentes de los casos clínicos 2 y 3. En el caso 2, el paciente, camionero de ganado porcino en activo, presentaba en la microbiota nasal una población heterogénea de las 2 variantes t011-CC398 discutidas anteriormente, mientras que en el caso 3, paciente exgranjero con más de 20 años de inactividad en una granja de vacas, sólo se detectó la variante SASM, viéndose las mismas diferencias moleculares entre los clados SARM y SASM y en las que también se evidenciaba una delección total del casete SCC*mec*, al comprobar la ausencia de los marcadores moleculares utilizados para la detección de SCC*mec* remanente. La presencia simultánea de las dos variantes ST398 del caso 2, también ha sido detectada en anteriores estudios, pero en este caso en cerdos (Verstappen et al., 2014).

Finalmente, la particularidad de la cepa SARM-t011-CC398 detectada en el caso 4, es la presencia del clúster de genes de evasión del sistema inmune humano (IEC A), tratándose de la única cepa SARM de esta línea genética donde se encontró este tipo de estructura en esta tesis. A día de hoy, tan sólo 2 publicaciones han detectado cepas SARM-CC398 de similares características conteniendo alguno de los tipos IEC (Haenni et al., 2011; Cuny et al., 2015). El hecho de haber sido detectada en un paciente exgranjero, cuya actividad profesional con animales de granja (vacas y pollos) terminó hace más de 20 años, nos hace pensar que la adquisición del IEC podría ser un rasgo de readaptación al hospedador humano (Cuny et al., 2015).

La alta adaptación del clon CC398 y la amplia plasticidad genómica demostrada, pone de manifiesto la importancia clínica y comunitaria de este clado, implicando el consiguiente riesgo en salud humana y animal.

Estructura poblacional de *S. aureus* en individuos sanos con diferentes grados de contacto animal. Dinámica de colonización.

Hemos visto las líneas genéticas predominantes en diferentes ambientes hospitalarios en relación a diversas patologías en pacientes con distintas características, pero: ¿cuál es la diversidad genética de *S. aureus* en individuos sanos? ¿Existe en ellos relación entre las líneas genéticas y su actividad profesional? ¿Es el contacto animal un factor de riesgo para su colonización por clones asociados a SARM/SASM-AG, al igual que lo que ocurría en los individuos hospitalizados?

Colonización fecal en individuos sanos sin evidencias de contacto animal

La prevalencia de *S. aureus* en muestras fecales de individuos sanos fue del 15% en nuestro estudio. La comparación de datos con otros estudios se hace complicada ya que existen muy pocos trabajos de las mismas características, habiéndose observado prevalencias de *S. aureus* entre el 8-31% en muestras fecales de individuos hospitalizados a mediados del siglo pasado (Greendyke et al., 1958; Grun et al., 1958; Williams et al., 1963) y más recientemente prevalencias que van desde el 6% en niños sanos (Dominguez et al., 2002) hasta el 20% en individuos con diversas situaciones clínicas (Acton et al., 2009), lo que sitúa nuestro estudio en valores intermedios. Todas las cepas obtenidas en este estudio resultaron ser SASM, lo que concuerda, en parte, con las bajas prevalencias de SARM (0-5%) detectadas en otros estudios en niños sanos (Dominguez et al., 2002) o en individuos testados al tiempo de su admisión en el hospital (Jernigan et al., 2003; Donskey et al., 2004; Baker et al., 2010). Es importante establecer la naturaleza de la colonización intestinal por *S. aureus* y es en esta cuestión donde surgen diversas hipótesis considerando su detección como pasajera, pudiendo o no estar asociada a infecciones, o colonizadora (Baker et al., 2010), evidenciándose mecanismos colonizadores diferentes entre la orofaringe y el intestino (Acton et al., 2009). Aunque existen varios estudios que postulan que la colonización nasal y cutánea previas por *S. aureus* podría actuar como precursor de una colonización intestinal posterior y viceversa (Lindberg et al., 2004a; Lindberg et al., 2004b; Boyce et al., 2005; Squier et al., 2005; Bhalla et al., 2007; Acton et al., 2009); y que una vez establecida la bacteria en la microbiota intestinal, esta localización puede actuar como reservorio (Donskey et al., 2004; Edgar-Cruz et al., 2007) o puede mediar patologías puntuales como gastroenteritis (Karstein et al., 2009) o exacerbar otras enfermedades intestinales (Gravet et al., 1999). A este respecto, la capacidad de adherencia a diferentes tejidos que ha demostrado poseer *S. aureus* parece postularse como una de las dianas para evitar su implantación, ya que algunos estudios han demostrado que esta adherencia podría ser inhibida por sustancias producidas por otras familias bacterianas,

como es el peróxido de hidrogeno en el caso del *Streptococcus viridans,* que ha demostrado competir contra *S. aureus* en el nicho orofaríngeo, llegando a desplazar a *S. aureus* (Uehara et al., 2001). De la misma forma, algunas especies de bacterias ácido-lácticas, como *Lb. reuteri*, *Lc. lactis* o *P. freundenreichii* han conseguido desplazar *in vitro* a *S. aureus* mediante la producción de peróxido de hidrógeno o reuterina (Vesterlund et al., 2006), lo que podría abrir nuevas formas terapéuticas probióticas.

En relación a la estructura poblacional encontrada entre los aislados de nuestro estudio, destaca la detección del CC30 en el 40% de las cepas. Como ya se ha dicho en esta tesis, este clon parece ser uno de los mejor adaptados al ser humano, ya sea como colonizador (Melles et al., 2008; Argudin et al., 2013) o como causante de infecciones (van Belkum et al., 2009), por lo que estos resultados apoyan esta hipótesis. La alta frecuencia de detección de la toxina TSST entre este tipo de cepas también resultó predecible, en base a la gran asociación demostrada en estudios previos (Deurenberg et al., 2009; Mégevand et al., 2010). Por otro lado, la detección en estas cepas de un número variable de enterotoxinas, incluida la detección en dos de ellas del cluster enterotoxigénico *egc-like* (*seg, sei ,sem, sen, seo y seu*) podría apoyar los casos de gastroenteritis mencionados anteriormente, que por otra parte suele encontrarse con frecuencia asociados a este tipo de cepas (Blaiotta et al., 2006; Argudin et al., 2013). Finalmente, la detección de diferentes tipos de IEC en todas las cepas CC30 (A, B, E y G) reafirma el carácter genético variable de este tipo de clones, especialmente adaptado a humanos.

La detección de dos cepas SASM pertenecientes a las líneas genéticas CC398 y CC133 es destacable, no tanto por la cepa t571-CC398 que como hemos visto está estrechamente relacionada con colonización y/o infección en humanos y que presentó el marcador humano IEC C (McCarthy et al., 2012; Price et al., 2012; David et al., 2013), sino por la cepa t3495-CC133, cuya detección en muestras fecales de individuos sanos fue pionera a nivel mundial, y cuya importancia reside en pertenecer a una línea genética estrechamente relacionada con animales ungulados, hipótesis apoyada por la detección del gen *luk-M*, la ausencia de IEC, y por la capacidad que demostró tener esta cepa para coagular el plasma bovino, rasgos frecuentemente detectados en cepas aisladas en ungulados (Gharsa et al., 2012). Además, la detección del gen de la toxina TSST, evidenciaba un perfil virulento. Curiosamente, algunos autores han dudado sobre el origen ancestral de las cepas CC133, situándolo primeramente en humanos pero sugiriendo su posible salto al nicho animal varios siglos atrás (Guinane et al., 2010). Es interesante remarcar que esta cepa fue encontrada en el único individuo de los 100 testados que reportó haber tenido un estrecho contacto con animales de granja,

fundamentalmente ungulados, por lo que todo apunta a un posible caso de zoonosis, aunque tampoco descartamos la implicación que la cadena alimentaria hubiera podido tener.

Fueron detectadas otras dos cepas tipadas como t002-ST5/CC5, que en anteriores estudios hemos asociado con el clon pediátrico (SARM-AH) (Oliveira et al., 2002), pero que en este caso, la ausencia de resistencia a meticilina, así como del resto de antibióticos testados, además de la ausencia del IEC en una de estas cepas nos hacen descartar una relación filogenética con el clon pediátrico (Aires de Sousa et al., 2004, Robert et al., 2011). De hecho, las características propias de estas cepas nos hacen dudar sobre su origen, y es que algunos autores han sugerido que la línea genética ST5 podría estar considerada de perfil multivariable con múltiples saltos entre diferentes hospedadores con la consiguiente adquisición de diferentes mecanismos adaptativos que la situarían en uno u otro origen (Lowder et al., 2009).

Otros complejos clonales fueron detectados en la microbiota intestinal de los individuos sanos testados, como el CC15 o CC59, normalmente asociados a infecciones comunitarias en nuestro país en su forma SARM (Vindel et al., 2014) o formando parte de la microbiota normal en el ser humano como SASM (Argudín et al., 2013). Asímismo, la detección del CC9, asociado en otros casos a ámbitos animales (Cui et al., 2009), destacó por presentar la exfoliatina A y el clúster enterotoxigénico *egc-like*.

Además de los ya citados factores de virulencia una amplia variedad de genes de hemolisinas fueron detectados, destacando *hlA* y *hlD*. Estas toxinas son encontradas de manera frecuente entre las cepas de *S. aureus,* pero su implicación en la exacerbación de bacteriemias hace destacable su detección (Dinges et al., 2000), sobre todo teniendo en cuenta que las cepas en las que fueron detectadas se encuentran en la mucosa intestinal, zona muy susceptible de sufrir pequeñas lesiones, que *S. aureus* podría aprovechar para invadir el torrente sanguíneo. Por otro lado, la toxina *aur* fue detectada en todas las cepas excepto la asociada a ungulados (CC133) y su implicación en las cascadas de coagulación humana (Prokesová et al., 1991; Sabat et al., 2000) podría volver a apuntar hacia el origen animal de esta cepa CC133. No fueron detectadas cepas que portaran los genes de las toxinas LPV, toxina que se cree que pueda ser vehiculizada por fagos desde cepas SASM hasta cepas SARM-AC (Deurenberg et al., 2009). Tampoco fue detectado el gen de la proteína asociada a la producción de biofilm, *bap*, en concordancia con la mayoría de estudios que exponen su baja prevalencia en *S. aureus* (Vautor et al., 2008). Cabe destacar, que en 5 de las cepas se detectaron los genes de las enterotoxinas *sea*, *seb* o *sec*, de importancia en la exacerbación de los cuadros clínicos de dermatitis atópica (Lee et al., 2013; Yeung et al., 2011) y es conveniente

relacionar ambos estudios ya que existen evidencias de que la colonización intestinal por *S. aureus* podría estar implicada en procesos atópicos cutáneos (Acton et al., 2009).

Los perfiles de resistencia detectados entre las 15 cepas estudiadas resultaron ser muy discretos, tan sólo destacando la resistencia a penicilina detectada en el 60% de estas cepas, valores que por otra parte son detectados en mayor proporción entre cepas de origen nasal (Lozano et al., 2011). Tan sólo 3 cepas presentaron resistencia a macrólidos y lincosaminas, resistencia mediada por los genes *erm*(A), *erm*(C) o *mph*(C), en el caso de las cepas CC9 y CC15 y *erm*(T) en el caso de la cepa CC398, determinantes de resistencia que ya han sido asociados de manera habitual a estos clones en esta tesis (Lozano et al., 2011; Vandendriessche et al., 2011; Price et al., 2012; Gómez-Sanz et al., 2013). Por último destacamos la resistencia a tobramicina y mupirocina (genes *ant*(4´)-Ia y *mup*(A), respectivamante), detectada en una de las cepas CC30 que fue tipada con el *spa* t7866, que fue agregado a la base de datos de Ridom Spa Server al resultar ser nuevo. La detección de resistencia a antibióticos asociados a ámbitos clínicos, como la tobramicina (Chua et al., 2011) o la mupirocina, es destacable, especialmente para este último antibiótico, por tratarse del tratamiento de elección para la descolonización nasal de *S. aureus* (Eicheinfield et al., 2014) y su detección en cepas procedentes de la microbiota intestinal resulta no esperado. Aunque también es cierto que estudios previos han hipotetizado acerca de la posibilidad de una recolonización extranasal por *S. aureus* tras una primera descolonización nasal con mupirocina (Dupeyron et al., 2002), caso del que podría tratarse nuestra cepa.

Dinámica de colonización y estudio longitudinal en individuos sanos con diferente grado de contacto con animales

En vista de la evidente asociación entre las explotaciones porcinas, los granjeros de estas y el clon SARM-AG CC398, decidimos realizar un estudio longitudinal dividido en 3 muestreos nasales y cutáneos a lo largo de un año en una familia de granjeros con diferentes grados de contacto con animales, pero en este caso, se trataba de una granja de ganado ovino y bovino, en la que además coexistían diferentes animales de compañía.

En este caso no detectamos ninguna cepa asociada al clon CC398, pero si detectamos otra de las líneas genéticas que parece estar polarizando el interés por la investigación acerca de los SARM-AG. Se trata de la cepa SARM t843-ST130/CC130, línea genética que desde hace unos años está siendo detectada con mucha frecuencia entre animales de granja (Becker et al., 2014), especialmente prevalente en vacas y su producto derivado, la leche (Schlotter et al., 2012). Cabe destacar que esta cepa fue detectada en una lesión cutánea superficial de uno de

los granjeros etiquetado con alto contacto animal y que a su vez se encontraba trabajando en una granja adosada a la de nuestro estudio en la fabricación tradicional de queso. Es probable que el elevado contacto animal o el contacto con la leche sea causa de la detección de esta cepa en humanos, evidenciando así un posible caso de zoonosis. Se trata de uno de los primeros casos descritos en granjeros en España y el primero relacionado con la producción tradicional de queso, con el riesgo que pudiera implicar la entrada de esta línea genética en la cadena alimentaria. El característico perfil molecular de esta cepa, entre el que encontramos la ausencia de resistencias a antibióticos no β-lactámicos, la presencia de genes propios de resistencia a meticilina y penicilina (*mec*(C) y *blaZ*-SCC*mec*XI, respectivamente), la detección del SCC*mec* XI y la presencia de un perfil de virulencia restringido a los genes *etD2* y *luk-DE*, son rasgos que concuerdan con las cepas CC130 que han sido caracterizadas en estudios previos en España, ya sean cepas involucradas en graves procesos clínicos como bacteriemias (Garcia-Garrote et al., 2014), o detectadas en otras circunstancias clínicas en ambientes hospitalarios o comunitarios (Romero-Gómez et al., 2013; Cano-García et al., 2014). Por otro lado, líneas genéticas similares han sido detectadas entre aislados procedentes de mamíferos en nuestro país, tanto pequeños (roedores, t1535-ST130) como grandes (ciervos) (Gómez et al., 2014; Gómez et al., 2015). Asimismo, la línea t843-ST2676/CC130 ha sido detectada en aguas residuales urbanas (Porrero et al., 2014), evidenciando la diseminación de este clon en diferentes ambientes en España. Más concernientes a nuestro estudio son la detección de estas cepas CC130 en explotaciones ganaderas (Ariza-Miguel et al., 2014) y en ríos próximas a ellas (Porrero et al., 2014b). En cuanto a la situación en otros países europeos, no dista de la situación en España, habiéndose detectado tanto en humanos como en una gran variedad de animales (vacas, ovejas, animales de compañía, etc.), incluso en tanques de leche, especialmente en Reino Unido, Alemania, Dinamarca o Francia (Paterson et al., 2014). Aunque el clon CC130 parece estar ya diseminándose por un amplio rango de hospedadores, la mayoría de autores ven a los animales como su origen más probable (Garcia-Alvarez et al., 2011). En nuestro caso, la ausencia de los genes IEC avala este posible origen animal, aunque también es cierto que en otros estudios se hacen eco de haber detectado cepas IEC positivas (Gómez et al., 2014), lo que podría sugerir el inicio adaptativo de este clon al hombre, como ocurría con las cepas CC398 analizadas en apartados anteriores de esta tesis. En cualquier caso, la presencia del clon CC130 en nuestro estudio, apunta hacia un claro caso de zoonosis, hipótesis avalada por recientes estudios europeos en el que confirman el contacto animal con el posible salto del CC130 al hombre (Barraud et al., 2013; Harrison et al., 2013; Petersen et al., 2013).

El resto de cepas detectadas fueron SASM y como viene siendo habitual el CC30 fue detectado en casi un 40% de las cepas, siendo detectada tanto en muestras nasales como cutáneas, evidenciando de nuevo su gran capacidad para colonizar al hombre (Argudin et al., 2013), siendo todas ellas IEC positivas y la mayor parte con el gen *tsst-1*, como parece ser habitual (Deurenberg et al., 2009). Pero destacamos especialmente una de ellas, la tipada como t11719-ST1333/CC30, aislada en un individuo con alto contacto con animales, por resultar negativa al IEC y presentar un fenotipo y genotipo de multirresistencia a antibióticos nada habitual entre este tipo de cepas (Chambers et al., 2009), todo ello podría relacionarse con el hecho de que anteriormente ha sido detectada en muestras caninas en Japón (Sasaki et al., 2012), lo que sugiere el origen animal de esta cepa, apoyado por la ausencia de IEC y la posible adquisición de resistencia, en la que los perros parecen estar involucrados como posibles vehículos intermediarios (Gómez-Sanz et al., 2013).

Otra de las cepas de interés detectada en un individuo clasificado en el estudio con contacto intermedio con animales de la granja, fue la tipada como t2678-ST133/CC133, que como hemos visto en el apartado anterior, se trata de otra variante de una línea genética asociada a ungulados (Porrero et al., 2012). De nuevo, la ausencia de los genes del IEC y la presencia del gen *luk-M*, prevalente en casos de mastitis bovinas (Schlotter et al., 2012), apuntan hacia un claro origen animal.

Por último, el resto de cepas detectadas entre los individuos con un nivel de contacto con los animales de la granja medio o bajo, fueron adscritas a los complejos CC22, CC45 y CC121, más relacionadas con ambientes hospitalarios (Chua et al., 2014). Especialmente destacable es el caso de la cepa t2155-ST121/CC121, ya que en su forma resistente a meticilina ha sido asociada a lesiones de piel y partes blandas (Conceiçao et al., 2011) y que curiosamente fue detectada en una lesión superficial de uno de los trabajadores esporádicos en la granja. En capítulos anteriores ya hemos visto la relación existente entre los clones CC22 y CC45 con ambientes hospitalarios, especialmente en sus formas SARM, y su habilidad para causar infecciones de diversa consideración (Chua et al., 2014; Baldan et al., 2015) o colonizar al ser humano con éxito (Melles et al., 2008). Lo destacable es la ausencia de clones relacionados con animales, precisamente en las cepas que derivan de trabajadores más esporádicos o convivientes de los granjeros.

El único individuo que mantuvo la colonización por la misma cepa (CC9) a lo largo del período muestreado fue el individuo 2, cepa que también ha aparecido en estudios anteriores de esta tesis (estudio DA y estudio de portadores fecales) y que parece estar ampliamente diseminada por diferentes ambientes y ecosistemas, teniendo en cuenta que previamente ha

sido detectada en cerdos de China (Cui et al., 2009), o asociada a bacteriemias en Francia (Lamamy et al., 2013), además de aparecer de forma frecuente en las estructuras poblacionales de portadores en España (Lozano et al., 2011; Argudin et al., 2013). El individuo 2, con un nivel de contacto con los animales de la granja alto, reportaba con frecuencia la aparición de eczemas en la cara y pequeñas lesiones nasales, y teniendo en cuenta su grado de colonización continuo con la cepa CC9, que a su vez portaba los genes de la exfoliatina A (*eta*), nos hizo pensar en su posible implicación. Dada la presencia del IEC, nos inclinamos más hacia un origen humano de la cepa.

Cabe destacar que de todas las muestras, *S. aureus* fue más prevalente entre las cutáneas (66,7%) que entre las nasales (35,5%) y que a su vez todos los individuos catalogados con un nivel de contacto con los animales de la granja alto o medio presentaron *S. aureus*, ya sea en piel o nariz. Lo que sigue la línea marcada entre los aislados con DA y pone de manifiesto que el contacto animal puede ser un factor de riesgo para una mayor colonización por esta bacteria, especialmente de clones asociados al ámbito animal (SARM/SASM-AG).

Transmisión de *S. aureus* a recién nacidos a través de la lactancia materna

Como hemos visto en estudios anteriores de esta tesis, la colonización intestinal por *S. aureus* parece adquirir importancia tanto desde el punto de vista de las infecciones que pueda producir con posterioridad como desde el punto de vista de la aportación beneficiosa en la que puede estar implicada. Existen estudios que evidencian que las primeras semanas de vida son cruciales para la implantación de la microbiota intestinal humana (Sim et al., 2013) y que la transmisión de bacterias desde la madre al hijo puede desempeñar un papel muy importante en el establecimiento de la microbiota intestinal en el recién nacido, ya sea de una forma únicamente colonizadora (Cho and Blaser, 2012) o como un riesgo para infecciones posteriores, especialmente por bacterias como *S. agalactiae* o *E. coli,* pero también por *S. aureus* (Novak et al., 2000; Behari et al., 2004; Saunders et al., 2007; Lamero-Cardoso et al., 2009).

La prevalencia por SASM/SARM en nuestro estudio son relevantes. En el caso materno, se detectó *S. aureus* en un 28,6% de las madres testadas y en un 9,6% se obtuvieron cepas MRSA. Más relevante es el caso de los recién nacidos, donde *S. aureus* fue detectado en el 57% de los recién nacidos y cepas SARM en el 23,8% de ellos. Estas prevalencias son significativamente más elevadas que las encontradas en estudios similares con diferentes localizaciones (no sólo la fecal), donde las prevalencias por SASM y SARM rondaban el 14,5% y 2,1-3,5%, respectivamente en el caso de las madres; y prevalencias por SASM y SARM en torno

a 10-14,5% y 0,7-3,5%, respectivamente en el caso de los recién nacidos (Andrews et al., 2008; Reush et al., 2008; Pinter et al., 2009). Si nos centramos en la prevalencia fecal de los recién nacidos, existen estudios cuyos datos en niños sanos caen o por debajo (6%) o por encima (60%), de las prevalencias por *S. aureus* detectadas en nuestro estudio (Börkstén et al., 2001; Dominguez et al., 2002, Lindberg et al., 2004). Prevalencias que en el caso de los SARM, oscilan entre 0-5% en el caso de niños sanos en guarderías o niños a su entrada en hospitales (Dominguez et al., 2002; Jernigan et al., 2003) y ascienden hasta el 24% en el caso de pacientes hospitalizados (Klotz et al., 2005). No obstante, algunos autores han corroborado que estas prevalencias suelen decaer a medida que avanza la edad en los niños (Börkstén et al., 2001).

Nuestro estudio muestra valores próximos a los detectados entre pacientes hospitalizados, por lo que no descartamos un origen hospitalario de las cepas, especialmente teniendo en cuenta que un tercio de las ellas fueron tipadas como SARM t322-ST5/CC5 con *agr* II y SCC*mec* IV, presentando un perfil de multirresistencia a antibióticos (macrólidos, lincosaminas y aminoglucósidos) bastante típico de cepas SARM-AH (Schaumburg et al., 2012), perfil hospitalario apoyado por la detección en su mayoría del IEC tipo F. No obstante, en 3 de estas cepas, detectamos el gen de la exfoliatina A (*eta*), implicada en ocasiones en casos de piel escaldada estafilocócica o impétigo (Massiuk et al., 2010), lo que resulta algo bastante infrecuente entre cepas con claro perfil hospitalario (Chua et al., 2014). Este clon estuvo involucrado en dos de las transmisiones confirmadas mediante PFGE en nuestro estudio, presentando el mismo patrón electroforético A, en cepas tanto de heces de los niños como de la leche materna. Ambas madres dieron a luz en el mismo hospital pero con una diferencia de 6 meses, lo que vuelve a sugerir que quizás se trate de un clon endémico del hospital o de su personal. De hecho, algunos estudios sugirieren que el personal hospitalario puede ser considerado una vía importante de transmisión tanto para las madres como para los niños (Boyce et al., 2005; Matussek et al., 2007) y que en el caso de que sólo la madre sea colonizada, su piel podría desempeñar un importante rol como vehículo de transmisión de *S. aureus* hacia el establecimiento de una microbiota intestinal determinada en el recién nacido (Gries et al., 2009). Y aunque en la madre la presencia de *S. aureus* pueda ser de naturaleza colonizadora, como de hecho algunos estudios han detectado en la admisión previo-parto de las madres en el hospital (Lazenby et al., 2012), en el recién nacido puede suponer un episodio infeccioso de diversa gravedad (Behari et al., 2004).

Numerosos estudios hacen hincapié en una adecuada formación e información de estos riesgos, tanto a las madres como al personal del hospital, con técnicas de amamantamiento más asépticas para las primeras o medidas preventivas como tratamientos

descolonizadores y/o aislamiento de la madre y el bebe en la misma habitación para los segundos (Kitajima et al., 2003; Garcia et al., 2014).

Respecto a las demás líneas genéticas detectadas, una vez más destacó el CC30 al encontrarse en más de un tercio de las cepas aisladas. Curiosamente fue detectado en 10 de las 12 parejas madre-hijo estudiadas, ya sea de forma simulatánea o no, evidenciando lo que llevamos diciendo durante casi todos los estudios incluidos en esta tesis acerca de su gran ubicuidad y expansión, además de su gran asociación con la presencia de la toxina *tsst-1*, y la exfoliatina A, también detectada en algunas de nuestras cepas CC30 (Deurenberg et al., 2009). Aunque sólo estuvo involucrado en los otros dos casos restantes de transferencia de *S. aureus* a través de la lactancia, obteniéndose el mismo patrón electroforético en ambos orígenes (leche y heces) para las cepas con ST34/CC30 del caso 3 o las ST1869/CC30 del caso 4, pero presentando diferentes patrones entre ambas STs, evidenciando de nuevo la gran diversidad genética que, en general, tienen todas las cepas CC30.

Además, otras líneas genéticas fueron detectadas en el resto de casos que aunque no tuvieron evidencia de transmisión también resultan importantes. Como por ejemplo la cepa SASM t148-ST1434/CC72, que ha sido previamente asociada a clones comunitarios, especialmente en su forma resistente a meticilina en países asiáticos (SARM-AC) (Harastani et al., 2014) o la cepa SASM t10664-ST8/CC8, siendo confirmado un nuevo tipo *spa* que fue agregado a la base de datos de Ridom Spa Server, línea genética que no presentó la toxina *pvl* y que por tanto se aleja del perfil típico de clon comunitario que suelen presentar sus homólogas resistentes a meticilina (SARM-AC) (Uhlemann et al., 2014).

La mayoría de cepas (73,2%) presentaron los genes de la leucocidina *luk-DE*, habitualmente asociada a cepas hospitalarias (Uhlemann et al., 2014). Cerca del 30% de las cepas, especialmente entre las CC8, CC30 o CC45, presentaron el gen de la proteína de unión al colágeno, *cna*, que parece encontrarse de manera más prevalente en cepas SARM o SASM-AC (Deurenberg et al., 2009). No se detectaron en ninguna de las cepas los genes *pvl*, *etb*, *etd*, *etD2* o *luk-M*.

En dos de los niños (caso 2 y 5) se detectó una persistencia por el mismo clon a lo largo de los 35 días del estudio, que resultó ser SARM-t322-ST5/CC5. Fue precisamente durante el último muestreo (35 días) cuando más prevalencia encontramos por *S. aureus* en los recién nacidos. Es importante destacar que ninguno de los recién nacidos que estaban colonizados por SARM durante el estudio, presentó infección por SARM en los 6 años posteriores desde nuestro estudio, lo que nos hizo plantearnos qué tipo de interacción podría

tener *S. aureus* como colonizador y la leche como vehículo de transmisión en edades tempranas en humanos.

La leche materna es conocida por ser un complejo fluido biológico especie-específico adaptado para satisfacer las necesidades nutricionales de nuestra especie en nuestros primeros estadios de vida, pero a su vez ayuda al correcto desarrollo del sistema inmune del bebé, y que en cierta medida, puede conferir protección frente a diversos patógenos (Ballard et al., 2013). Además, algunos autores han sugerido que la leche materna, además de un soporte nutritivo, confiere un flujo constante de microorganismos que contribuyen al establecimiento de una microbiota bacteriana normal, entre la que suelen encontrarse de manera frecuente diferentes especies estafilocócicas (Fernández et al., 2013), especialmente *S. aureus* y *S. epidermidis,* conocidos entre otras cosas por poder metabolizar los oligosacáridos presentes en la leche de origen humano (Hunt et al., 2008). Enfermedades como la obesidad, enfermedad de Chron y otras patologías intestinales han resultado estar relacionadas con el tipo de microbiota intestinal que cada ser humano tenemos, pudiendo actuar en nuestro beneficio o en detrimento de nuestra salud (Redimbo et al., 2014). Es conocido el viaje de diferentes bacterias, entre ellas *S. aureus*, desde el intestino de la madre hasta las glándulas mamarias durante las últimas etapas del embarazo, y esto no suele ser iniciativa de la propia bacteria, sino que su transporte está mediado por monocitos intestinales (Martin et al., 2004; Pérez et al., 2007). Por todo ello, no podemos sino admitir que, aunque *S. aureus* sea capaz de causar infecciones como patógeno oportunista, también forma parte de nuestra microbiota normal en aproximadamente un 60% de la población mundial (ISFHH, 2006), por lo que su colonización también podría aportarnos beneficios. De hecho, estudios previos han corroborado que la temprana colonización por *S. aureus*, incluso de cepas toxigénicas, disminuye el riesgo de desarrollar cuadros alérgicos y algunos procesos atópicos como eczemas (Lundell et al., 2007; Lundell et al., 2009).

En esta tesis se ha demostrado claramente la transferencia de cepas de *S. aureus* de la madre al recién nacido a través de la leche y como los mismos clones de *S. aureus* son detectados en las muestras de leche materna y en las heces de sus bebés. Esto demuestra el papel importante que tiene la leche materna para el establecimiento de la microbiota intestinal temprana en el recién nacido.

Papel de la cadena alimentaria en la transmisión de *S. aureus*

Detectamos *S. aureus* en 7 de las 100 muestras cárnicas testadas, siendo una de las cepas resistente a meticilina (SARM), lo que supuso una tasa de contaminación del 7% para *S. aureus* y del 1% para SARM. Tasas bastante inferiores a las detectadas en otras partes del mundo, donde se han estimado entre el 16-45% por *S. aureus* y entre 0-37% en el caso de SARM (Wendlandt et al., 2013), aunque similar a la encontrada en un estudio previo de nuestro grupo realizado en la misma área geográfica, donde rondaba el 1,6% (Lozano et al., 2009). Los datos más alarmantes llegan desde Alemania con tasas de contaminación por SARM de hasta 37% (Febler et al., 2011), detectándose tasas moderadas de entre 3%-12% en diferentes países como Holanda, EEUU o Canadá (van Loo et al., 2007; Pu et al., 2009; de Boer et al., 2009; Weese et al., 2010, van Cleef et al., 2010), tasas más parecidas a nuestro estudio (<2%) en países como Italia, Francia, Corea o Japón, además de en otros estudios norteamericanos (Lee, 2003; Kitai *et al*., 2005; Normanno *et al*., 2007; Kerouanton *et al*., 2007; Hanson *et al*., 2011).

Si diferenciamos entre los distintos orígenes, destacamos una prevalencia por *S. aureus* y SARM del 11,9% y del 2,9%, respectivamente, en nuestras muestras de carne procedente de cerdo, algo que viene siendo habitual en este tipo de muestras, incluso con prevalencias ampliamente superiores, tanto en países europeos (Wendlandt et al., 2013) como norteamericanos (Abdalrahman et al., 2015), donde se obtuvo *S. aureus* en un 43,3% de las muestras de carne porcina. La cepa SARM que detectamos fue aislada de una muestra de carne de cerdo, siendo tipada como t011-ST398/CC398 con *agr* I y SCC*mec* V, línea genética que como hemos visto en anteriores estudios de esta tesis, está altamente asociada al ganado porcino. En este caso resulta evidente su origen animal, siendo IEC negativa, y que además presentaba todas las características moleculares con la que se caracterizan este tipo de cepas SARM-AG (Uhlemann et al., 2012), como es la resistencia a tetracilina, macrolidos, lincosaminas y en nuestro caso además la resistencia a estreptomicina. Además destaca la presencia de un perfil de virulencia limitado a un número variable de hemolisinas, y el gen *cna*, que como hemos visto es muy prevalente entre este tipo de cepas (Lozano et al., 2012). La detección de esta línea genética en alimentos ha sido estudiada con anterioridad en gran parte del mundo, aunque especialmente en Centroeuropa (van Loo *et al*., 2007; de Boer *et al*., 2009; Feßler *et al*., 2011, Agerso et al., 2012; Petternel et al., 2014).

Las 6 cepas SASM restantes detectadas fueron encontradas entre las muestras de cerdo (3 cepas) y las muestras de pollo (3 cepas), que en el caso del pollo representó una tasa de contaminación por *S. aureus* del 10%, tasa bastante más baja a las detectadas en otros

países de Europa (Wendlandt et al., 2013). Cuatro de estas cepas, 2 para cada origen, fueron tipadas como t015-ST45/CC45 (3) o t305-ST617/CC45 (1), ambas variantes con *agr* I y un fenotipo de resistencia restringido a penicilina (*blaZ*) o tetraciclina (*tet*(M)). Este tipo de línea genética ha sido detectada con frecuencia en carniceros y granjeros dedicados a la producción de carne al por mayor (Argudín et al., 2012; Boost et al., 2013a) y es que existen muchos estudios que asocian una gran parte de la contaminación por *S. aureus*, a la previa colonización de los manipuladores de alimentos (van Cleef et al., 2010; de Jonge et al., 2010; Argudín et al., 2012; Gallina et al., 2013). Dado que todas estas cepas contenían el clúster de genes de evasión del sistema inmune humano, podríamos considerar a estas cepas de origen humano, en el que el manipulador de alimentos podría haber tenido implicación.

Algo parecido ocurre con las cepas SASM t002-ST5/CC5 (detectada en carne de cerdo) y t209-ST109/CC9 (detectada en carne de pollo), que aunque en su forma SARM han sido relacionadas con el clon pediátrico hospitalario y con cerdos asiáticos, respectivamente (Oliveira et al., 2002; Cui et al., 2009), en este caso parecen forman parte de una estructura poblacional normal entre manipuladores de alimentos en nuestro país (Argudín et al., 2012). Como vemos, una de las vías que más riesgo conlleva en la inclusión de cepas *S. aureus* en la cadena alimentaría podría estar en la transmisión directa por parte de estos manipuladores, especialmente entre aquellos que regentan pequeñas carnicerías y en las que las medidas de protección y los puntos de control no están tan establecidas como entre aquellos que trabajan en la producción a gran escala de productos alimenticios manufacturados (Andritsos et al., 2012; Boost et al., 2013b). Es destacable la detección en casi todas las cepas SASM de los clústeres enterotoxigénicos *egc* o *egc-like*, ya que como sabemos, es la producción de estas toxinas en el alimento lo que da lugar a las toxoinfecciones alimentarias (Argudin et al., 2010; Wendlandt et al., 2013) y cuya presencia, especialmente la presencia de las toxinas *seg* y *sei,* incluidas en estos clústeres, (Jarraud et al., 2001; Argudín et al., 2010), se ha asociado de manera directa con riesgo de brotes de envenenamiento por alimentos (Johler et al., 2015; Suzuki et al., 2015). Además de estas, las toxinas *sea*, *seb* y *sec*, presentes en algunas de nuestras cepas, y que han sido relacionadas en estudios previos con la exacerbación de la dermatitis atópica, también han sido postuladas como otras de las responsables de estas toxoinfecciones (Vitale et al., 2015), donde especialmente la enterotoxina A, ha demostrado ser termorresisente a la cocción (Pepe et al., 2006), con el riesgo añadido que conlleva para la salud pública.

Virulencia de *S. aureus* en el modelo *C. elegans*

Hace ya unos años que el uso de modelos animales, como el *C. elegans,* para testar la patogenia de *S. aureus*, ha demostrado tener gran correlación y poder discriminatorio, especialmente para detectar las moléculas o rasgos genéticos presentes en este microorganismo y que pudieran determinar su diferente efecto nematocida (García-Lara et al., 2005). Y es que algunos genes presentes en *C. elegans* han sido directamente relacionados con la presencia de otros homólogos en otras especies de mamíferos, entre ellos el hombre (Begun et al., 2005), lo que avala la extrapolación de los resultados obtenidos a nuestra especie. En estudios previos, en general, se ha determinado que especies bacterianas Gram postivas, como *S. aureus*, son capaces de favorecer la sobreexpresión de genes de defensa en *C. elegans* (Sinha et al., 2012). Esta sobreexpresión está mediada por la producción de ácidos lipoteicoicos por parte de *S. aureus*, con los cuales es capaz de causar un efecto patogénico más severo (JebaMercy et al., 2015) con la reducción de la vida del nematodo y de su progenie. Pero, ¿qué implicación tienen los distintos perfiles génicos estafilocócicos presentes en las diferentes líneas genéticas que hemos visto en esta tesis?

Mediante este modelo testamos 15 cepas de *S. aureus* procedentes de esta tesis y de la colección de *S. aureus* de la Universidad de La Rioja con resultados muy interesantes. Tras un análisis estadístico factorial de correspondencias, llegamos a la conclusión que, las variables que más definían los diferentes grupos de patogenia eran, fundamentalmente, la presencia de casetes cromosómicos SCC*mec* y el contenido fágico, especialmente los fagos ϕ2, ϕ3 y ϕ5, estos últimos relacionados estrechamente con la vehiculización del gen *pvl* y los genes *scn*, *sak* y *chp* integrados en el IEC (Goerke et al., 2009), que algunos autores han relacionado su presencia con una mayor patogenia (Wu et al., 2012). En el caso de la resistencia a meticilina, el casete SCC*mec* ya había sido postulado como un factor clave en la patogenia de *S. aureus* (Kabayashi et al., 2009; Day et al., 2012; Thompon et al., 2014), algo que no está tan claro en cuanto a la relación con la virulencia, ya que algunos autores sugieren que aunque algunos genes de virulencia pueden ser determinantes para la patogenia, es la línea genética de la cepa donde estén integrados la que define mejor el diferente efecto patogenico (Wu et al., 2012;), dando más peso al tipo *spa* o al MLST (Wu et al., 2013) o incluso al locus *agr* (JebaMercy et al., 2011; Sifri et al., 2003), que como sabemos es el operón regulador de la virulencia estafilocócica.

De esta manera, y tras un test de mortalidad/supervivencia de entre 96/120 horas, tiempo suficiente postulado en estudios previos (JebaMercy et al., 2011; Wu et al., 2013), detectamos 4 grupos de cepas cuyo efecto patogénico lo clasificamos fundamentalmente

entre alto (A), intermedio-alto (IA), intermedio-bajo (IB) o bajo (B). Las cepas que resultaron ser más virulentas en el modelo animal fueron cepas SARM de las líneas genéticas CC130 y CC398 que como hemos visto en esta tesis son asociadas a un perfil animal, SARM-AG (Wulf et al., 2008; Becker et al., 2014), en el que precisamente su perfil de virulencia no destaca por abultado, detectándose sólo genes *cna* para las CC398 o *etD2* para las CC130. En este caso la ausencia de genes de virulencia destacados en clínica nos hace pensar que estos resultados pueden ser debidos al trasfondo genético de las cepas, y que concuerda con lo sugerido por algunos autores (Wu et al., 2010b), aunque no precisamente en estas líneas genéticas. De hecho, se trata del primer estudio de estas características donde se testan este tipo de clones. Debemos hacer una especial mención al origen de estas cepas, ya que una de las cepas SARM-CC398 procedía de un estudio previo en nuestro grupo donde se la había asociado a un caso fatal de empiema pulmonar (Lozano et al., 2011), mientras la otra cepa CC398 fue detectada en el estudio epidemiológico del caso clínico 1 en uno de los cerdos muestreados. La cepa CC130 procedía del granjero con una lesión cutánea del estudio de la granja bovina, y que hemos relacionado con la entrada en la cadena alimentaria a través de la fabricación tradicional de queso.

Entre las cepas con una patogenia intermedia-alta (IA), encontramos mayor variedad aunque todas ellas también fueron resistentes a meticilina (SARM). Destacamos la presencia de otra cepa CC130, que en este caso procedía de un pequeño mamífero muestreado en otro estudio previo de nuestro grupo (Gómez et al., 2014). La diferencia en su carácter patogénico puede ser debida a este origen más “natural” y al hecho de que la aislada en humano contenía también la leucocidina *luk-DE* que ha sido relacionada con dermonecrosis (Gravet et al., 1998; Kaneco et al., 2004), lo que podría explicar esta diferente actividad nematicida. El resto de cepas con patogenia IA, pertenencientes a los CC5, CC30 y CC88, tenían en común la presencia del gen de la leucotoxina de Panton-Valentine (*pvl*). Como ya hemos adelantado, aunque no parece que esta toxina sea un predictor de virulencia en el modelo *C. elegans* (Labadeira-Rey et al., 2007; Zhang et al., 2008), nuestros resultados evidencian que el impactante perfil patogénico que ha demostrado tener la LPV en clínica, parecen tener algo que ver. Aunque tampoco podemos descartar que se deba al trasfondo genético global de estas cepas, teniendo en cuenta que proceden de casos clínicos de diversa severidad. Por ejemplo, las cepas CC5 y CC88 proceden del estudio de infecciones estafilocócicas por bacteriemias, mientras que la cepa CC30 fue la responsable del caso de forunculosis recurrente familiar también incluído en esta tesis.

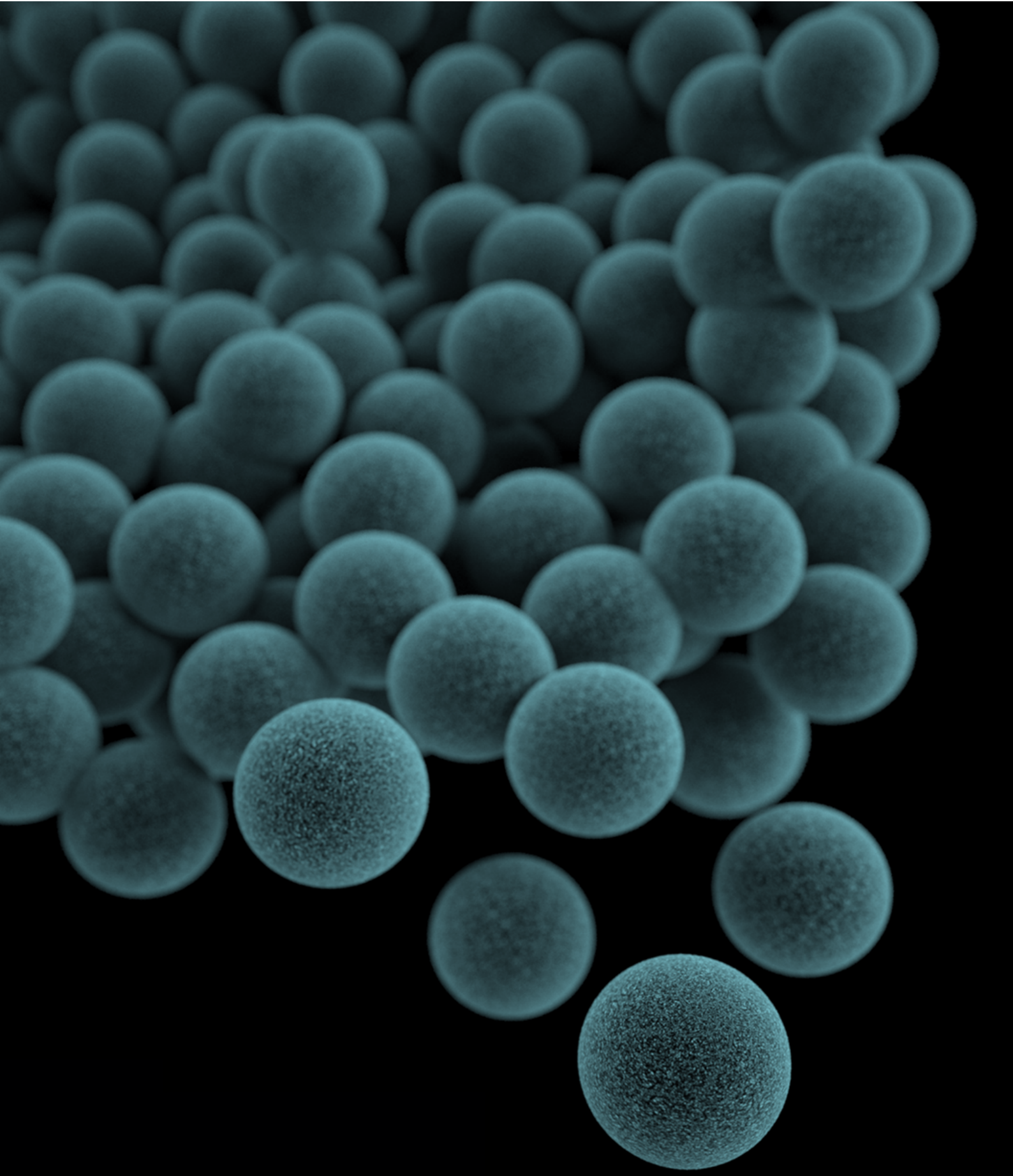
Por otro lado, las restantes 7 cepas fueron clasificadas con niveles intermedios-bajos (IB) o bajos (B) de patogenia. Cabe destacar la detección en este grupo de cepas SASM-CC398, tanto de la línea más asociada a animales con spa-type t011 como la más asociada a humanos con spa-type t571 (Price et al., 2012), siendo algo más virulentas las *spa* t011 que la cepa *spa* t571. Esto pone de manifiesto varias cosas, por una parte que la línea SASM-t011-CC398 evolucionada de la línea homologa SARM de animales resulta menos patogénica que su homóloga SARM, por lo que de nuevo todo apunta a que el SCC*mec* tiene mucho peso en la acción patogénica sobre *C. elegans*; y por otra parte que la cepa SASM-t571-CC398 podría postularse como colonizadora asintomática, incluso en aquellos casos en los que ha sido detectada en casos clínicos (Vandendriessche et al., 2011). Asímismo, otra de las cepas del grupo IB fue la tipada como t3495-ST133/CC133, asociada con anterioridad a animales ungulados (Guinane et al., 2010). Su detección en uno de los individuos sanos del estudio de portadores fecales, nos hace pensar en un estadio colonizador de esta línea, ya que el individuo no refirió ninguna patología intestinal asociada. La presencia en esta cepa de los genes *tsst-1* y *luk-M* tampoco parece afectar mucho a la dinámica de muerte en nuestro estudio.

Finalmente, las 3 cepas restantes, pertenecientes a los CC6, CC9 y CC22, fueron algunas de las cepas aisladas en muestras cutáneas de los niños con dermatitis atópica con SCORAD entre severo y moderado. A vista del resultado en nuestro test de supervivencia no parecería que existiera relación entre la presencia de la cepa y la severidad de la DA, pero tampoco podemos afirmar que la presencia de estas cepas no haya podido exacerbar las lesiones de los niños.

Si atendemos al origen sugerido de las cepas testadas, vemos como en general las cepas SARM-AG (CC398 y CC130) resultaron ser más virulentas que las demás, algo que no podemos comparar con otros estudios, ya que este es el primero que ha realizado estos test en este tipo de cepas. Por otro lado, observamos que las cepas SARM-AC (CC30, CC88) presentaron perfiles más patogénicos que las cepas SARM/SASM-AH (CC5 CC6, CC22), algo que ya ha sido corroborado por otros autores (Wu et al., 2013), aunque dada la similitud de los resultados para ambos tipos de cepas, especialmente en el caso de las cepas SARM-AH CC5, tampoco descartamos que el carácter patogénico pueda deberse al trasfondo genético de estas cepas, como previos estudios también han constatado (Day et al., 2012; Wu et al., 2013). Tampoco debemos menospreciar los resultados en las cepas SASM, dado que la comparación con cepas SARM ha podido apantallar su poder patogénico. De hecho, algunos estudios en los

que sólo se tuvo en cuenta cepas SASM, también encontraron gradientes de virulencia en los que las cepas SASM CC9 fueron las más patogénicas (Wu et al., 2012).

Como vemos el modelo *C. elegans* puede ser considerado un buen indicador del carácter virulento de diferentes cepas de *S. aureus* en el hombre, dada que la colonización intestinal de este microorganismo en *C. elegans* y la diferente interacción en su organismo han sido correlacionadas con el efecto que podría causar en el hombre (Sifri et al., 2003). Por otro lado, este modelo ha servido para descubrir que ciertas bacterias o extractos de plantas, añadidos al mismo tiempo y en las mismas condiciones iniciales que los test control, pueden proteger a *C. elegans* ante la infección y destrucción por *S. aureus* (Yun et al., 2014; Kong et al., 2014), abriendo una nueva puerta a los tratamientos probióticos.



Conclusiones

“Estudia las frases que parecen ciertas y ponlas en duda”

David Riesman (Psicólogo)

CONCLUSIONES

1. Un tercio de los aislados *S. aureus* de hemocultivos del Hospital RV-Z presentaron el fenotipo SARM, siendo t067-ST125/CC5 la línea genética mayoritaria (66,7%), caracterizada por un fenotipo de multirresistencia. Dicha línea genética fue menos frecuente entre aislados SARM no hematológicos (37,1%).

2. Se detecta una amplia distribución del clon CC30 entre los aislados *S. aureus* de control epidemiológico, postulándose como clon de naturaleza colonizadora en el caso de las cepas SASM, y una naturaleza más infectiva en el caso de las cepas SARM, pese a presentar una frecuencia minoritaria entre las cepas con significancia clínica. En este clon es destacable el contenido en genes de virulencia, como *tsst-1* (en SASM) o *pvl* (en SARM).

3. Los pacientes con dermatitis atópica presentan frecuentemente colonización cutánea y/o nasal por SASM, pertenecientes a muy diversas líneas genéticas, entre las que se incluyen CC1, CC97 y CC398. En los casos de mayor severidad del proceso DA, se detectan los clones CC5 y CC45, la mayor parte portadores del gen de virulencia *tsst-1* y con el sistema IEC tipo F.

4. La resistencia a tetraciclina es un buen marcador fenotípico para la detección del linaje CC398 entre los aislados SARM, ya que entre el total de los aislados SARM del Hospital UMS-Z que presentaron resistencia a tetraciclina (2011-2012), la línea genética mayoritaria fue CC398 (60,2%).

5. Se confirma que el contacto con animales de granja es un factor de riesgo para la colonización o infección por SARM CC398, detectándose esta variante genética con mayor frecuencia en pacientes con SARM-Tet^{R} que refieren contacto con animales de granja (76%), en relación con los que no lo tienen (50%) ($p<0.05$). No obstante, la detección de SARM CC398 en pacientes sin contacto con animales de granja, sugiere que la transferencia humano-humano se puede estar produciendo.

6. Se constata la persistencia en el estado de portador nasal por *S. aureus* CC398 en exgranjeros y la capacidad evolutiva de esta línea genética, ya sea por pérdida del cassete cromosómico SCCmec V o por la adquisición de características propias de las líneas más asociadas a humanos, como el IEC.

7. Se detecta una moderada prevalencia de *S. aureus* (15%) formando parte de la microbiota intestinal de individuos sanos, todas ellas SASM, siendo uno de los primeros estudios en individuos sanos y el primero en el que se detectan líneas genéticas asociadas a ungulados (CC133) o al clon t571-CC398 (variante humana del CC398 asociado a ganado porcino). Asimismo, destaca el bajo contenido en genes de resistencia y alto en genes de virulencia de las cepas SASM (como *eta o tsst-1*).

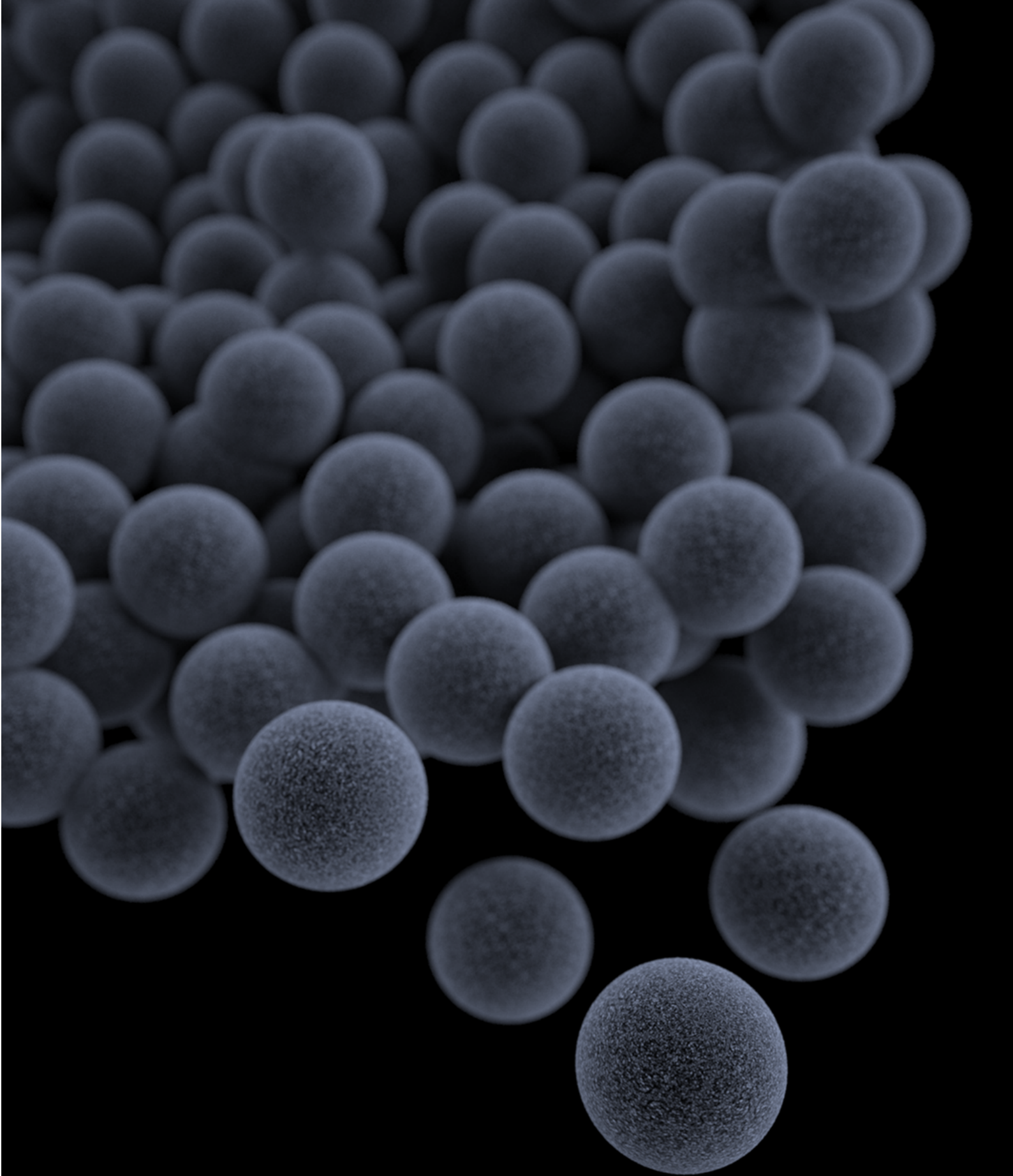
8. La línea genética emergente SARM CC130-t843 *mec*C-positiva fue detectada en la lesión cutánea de un granjero involucrado en el cuidado de animales y la fabricación de queso, siendo uno de los primeros casos de posible zoonosis por esta línea genética detectados en España y evidencia su posible transferencia a través de la cadena alimentaria.

9. Se confirma la transferencia de *S. aureus* a recién nacidos a través de la lactancia materna y su implantación intestinal durante el primer mes de vida. Líneas genéticas frecuentemente asociadas a ámbitos hospitalarios y comunitarios, como CC5 y CC30, fueron detectados en los casos de transferencia madre-niño.

10. Se detectó una tasa de contaminación por *S. aureus* del 7% en las muestras cárnicas analizadas, de las cuáles una cepa fue SARM de la línea genética CC398 (1% de las muestras totales analizadas), obtenida de muestra porcina. El papel del cerdo como vehículo de transferencia de SARM CC398 a través de la cadena alimentaria se sugiere en esta tesis, y aunque los niveles de contaminación detectados son bajos, sería conveniente su monitorización en alimentos cárnicos.

11. El sistema IEC se detecta en la mayor parte de las cepas de *S. aureus* de origen humano, excepto en los linajes asociados a animales, como es el caso de SARM CC398 y CC130 o en cepas SASM CC133. Por tanto, el sistema IEC se postula como buen marcador de adaptación al huésped humano, aunque se han evidenciado situaciones intermedias que podrían reflejar distintos estadios evolutivos en *S. aureus*.

12. Se evidencian diferencias de poder patogénico de *S. aureus* en el modelo de *C. elegans*. La mayor patogenicidad de las cepas se asocia a la presencia de casetes cromosómicos de resistencia a meticilina y contenido en fagos.



Referencias

“En el campo de la investigación el azar no favorece más que a los espíritus preparados”

Louis Pasteur (Químico y Microbiólogo)

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 37:127-137.

Abdalrahman LS, Wells H, Fakhr MK. *Staphylococcus aureus* is More Prevalent in Retail Beef Livers than in Pork and other Beef Cuts. Pathogens. 2015; 4(2):182-98.

Abdelbary MM, Wittenberg A, Cuny C, Layer F, Kurt K, Wieler LH, Walther B, Skov R, Larsen J, Hasman H, Fitzgerald JR, Smith TC, Wagenaar JA, Pantosti A, Hallin M, Struelens MJ, Edwards G, Böse R, Nübel U, Witte W. Phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus* CC398 reveals a sub-lineage epidemiologically associated with infections in horses. PLoS One. 2014; 9(2):e88083.

Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that nasal carriage and what is its clinical impact? Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2009; 28, 115-127.

Agersø Y, Hasman H, Cavaco LM, Pedersen K, Aarestrup FM. Study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retailmeat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. Vet Microbiol. 2012; 157(1-2):246-50.

Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004; 40(2):101-11.

Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H; Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. J Clin Microbiol. 2008; 46(9):2912-7.

Aires-de-Sousa M, Correia B, de Lencastre H; Multilaboratory Project Collaborators. Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. J Clin Microbiol. 2008; 46(9):2912-7.

Albrecht N, Jatzwauk L, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. Clonal replacement of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a German university hospital over a period of eleven years. PLoS One. 2011; 6(11):e28189.

Ali H, Nash JQ, Kearns AM, Pichon B, Vasu V, Nixon Z, Burgess A, Weston D, Sedgwick J, Ashford G, Mühlschlegel FA. Outbreak of a South West Pacific clone Panton-Valentine leucocidin-positive meticillin- resistant *Staphylococcus aureus* infection in a UK neonatal intensive care unit. J. Hosp. Infect. 2012; 80:293–298.

Anderson MJ, David ML, Scholz M, Bull SJ, Morse D, Stevens MH, Peterson ML. Efficacy of Skin and Nasal Povidone-Iodine Preparation against mupirocin resistant MRSA and *Staphylococcus aureus* within the anterior nares. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(5):2765-73.

Andrews WW, Schelonka R, Waites K, Stamm A, Cliver SP, Moser S. Genital tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: risk of vertical transmission in pregnant women. Obstet Gynecol. 2008; 111(1):113-8.

Andritsos ND, Mataragas M, Mavrou E, Stamatiou A, Drosinos EH. The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. Meat Sci. 2012; 91(4):486-9.

Antonanzas F, Lozano C, Torres C. Economic Features of Antibiotic Resistance: The Case of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Pharmacoeconomics. 2015; 33(4):285-325.

Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2006; 12:16-23.

Argudín MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR. Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. Microb Pathog. 2013; 54:26-33.

Argudín MA, Fetsch A, Tenhagen BA, Hammerl JA, Hertwig S, Kowall J, Rodicio MR, Käsbohrer A, Helmuth R, Schroeter A, Mendoza MC, Bräunig J, Appel B, Guerra B. High heterogeneity within methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and *spa* and SCC*mec* types. Appl Environ Microbiol 2010; 76:652-658.

Argudín MA, Mendoza MC, Méndez FJ, Martín MC, Guerra B, Rodicio MR. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. J Clin Microbiol 2009; 47:2097-2105.

Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins (Basel) 2010; 2:1751-1773.

Argudín MA, Tenhagen BA, Fetsch A, Sachsenröder J, Käsbohrer A, Schroeter A, Hammerl JA, Hertwig S, Helmuth R, Bräunig J, Mendoza MC, Appel B, Rodicio MR, Guerra B. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. Appl Environ Microbiol 2011; 77:3052-3060.

Argudín MA, Mendoza MC, González-Hevia MA, Bances M, Guerra B, Rodicio MR. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(8):2930-5.

Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring *mecC* in Livestock in Spain. J Clin Microbiol 2014; 52(11):4067-9.

Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. Emerg Infect Dis 2005; 11:711-714.

Arriola CS, Güere ME, Larsen J, Skov RL, Gilman RH, Gonzalez AE, Silbergeld EK. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs in Peru. PLoS One 2011; 6:e28529.

Aspiroz C, Martín I, Lozano C, Torres C. [First case of community-acquired Panton-Valentine leukocidin-positive (ST88) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriemia in Spain in a patient with meningitis]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(1):70-1.

Bae T, Banger AK, Wallace A, Glass EM, Aslund F, Schneewind O, Missiakas DM. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(33):12312-7.

Baker SE, Brecher SM, Robillard E, Strymish J, Lawler E, Gupta K. Extranasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at admission to an acute care Veterans Affairs hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31(1):42-6.

Balachandra S, Pardos de la Gandara M, Salvato S, Urban T, Parola C, Khalida C, Kost RG, Evering TH, Pastagia M, D'Orazio BM, Tomasz A, de Lencastre H, Tobin JN. Recurrent furunculosis caused by a community-acquired *Staphylococcus aureus* strain belonging to the USA300 clone. Microb Drug Resist 2015; 21(2):237-43.

Baldan R, Rancoita PM, Di Serio C, Mazzotti M, Cichero P, Ossi C, Biancardi A, Nizzero P, Saracco A, Scarpellini P, Cirillo DM. Epidemic MRSA clone ST22-IV is more resistant to multiple host- and environment-related stresses compared with ST228-I. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(3):757-65.

Ballard O & Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. Pediatr Clin North Am. 2013; 60: 49-74.

Balma-Mena A, Lara-Corrales I, Zeller J, Richardson S, McGavin MJ, Weinstein M, et al. Colonization with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis: a cross-sectional study. Int J Dermatol. 2011; 50(6):682-8.

Bannerman T, Hannock G, Tenover F. PFGE as a replacement for bacteriophage typing of *Staphyloccocus* aureus. J Clin Microbiol 1995; 3:551-555.

Baquero F. On the shifting balance: the case of *Staphylococcus aureus* CC398. MBio 2012; 3:pii:e00078-12.

Barraud O, Laurent F, François B, Bes M, Vignon P, Ploy MC. Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* variant. J Antimicrob Chemother 2013; 68(12):2949-50.

Barrio MB, Rainard P, Prévost G. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. Microbes Infect. 2006 Jul;8(8):2068-74. Epub 2006 May 26.

Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Feltrin F, Zini M, Aarestrup FM. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishingholdings. Vet Microbiol 2010; 142:361-366.

Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol 2003; 41:1434-1439.

Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The "mec alphabet" with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. Int J Med Microbiol 2014; 304:794-804.

Begun J, Gaiani JM, Rohde H, Mack D, Calderwood SB, Ausubel FM, Sifri CD. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. PLoS Pathog. 2007; 3(4):e57.

Begun J, Sifri CD, Goldman S, Calderwood SB, Ausubel FM. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. Infect Immun. 2005; 73(2):872-7.

Behari P, Englund J, Alcasid G, Garcia-Houchins S, Weber SG. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to preterm infants through breast milk. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004; 25(9):778-80.

Bender J, Strommenger B, Steglich M, Zimmermann O, Fenner I, Lensing C, Dagwadordsch U, Kekulé AS, Werner G, Layer F. Linezolid resistance in clinical isolates of Staphylococcus epidermidis from German hospitals and characterization of two cfr-carrying plasmids. J Antimicrob Chemother 2015; 70(6):1630-8.

Benson MA, Ohneck EA, Ryan C, Alonzo F 3rd, Smith H, Narechania A, Kolokotronis SO, Satola SW, Uhlemann AC, Sebra R, Deikus G, Shopsin B, Planet PJ,Torres VJ. Evolution of hypervirulence by a MRSA clone through acquisition of a transposable element. Mol Microbiol. 2014; 93(4):664-81.

Bhalla A, Aron DC, Donskey CJ. *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of *S. aureus* on skin of hospitalized patients. BMC Infect Dis. 2010; 11: 7:105.

Bieber T. Atopic dermatitis. N Engl J Med 2008; 358(14):1483-94.

Bieber T. Atopic dermatitis. N Engl J Med 2008; 358(14):1483-94.

Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol. 2001; 108: 516-20.

Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. Appl Environ Microbiol 2006; 72:6117-6123.

Boost M, Ho J, Guardabassi L, O'Donoghue M. Colonization of butchers with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Zoonoses Public Health. 2013b; 60(8):572-6.

Boost MV, Wong A, Ho J, O'Donoghue M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from retail meats in Hong Kong. Foodborne Pathog Dis. 2013a; 10(8):705-10.

Bosch T, de Neeling AJ, Schouls LM, van der Zwaluw KW, Kluytmans JA, Grundmann H, Huijsdens XW. PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398. BMC Microbiol 2010; 10:40.

Boyce JM, Havill NL, Maria B. Frequency and possible infection control implications of gastrointestinal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2005; 43(12):5992-5.

Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:925-929.

Brauner J, Hallin M, Deplano A, De Mendonça R, Nonhoff C, De Ryck R, Roisin S, Struelens MJ, Denis O. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones circulating in Belgium from 2005 to 2009: changing epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32(5):613-20.

Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA. Nucleotide sequence analysis of IS*256* from the *Staphylococcus aureus* gentamicintobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn*4001*. Gene 1989; 81:361-367.

Camoez M, Sierra JM, Pujol M, Hornero A, Martin R, Domínguez MA. Prevalence and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. PLoS. One. 2013; 8, e72828.

Campanile F, Bongiorno D, Falcone M, Vailati F, Pasticci MB, Perez M, Raglio A, Rumpianesi F, Scuderi C, Suter F, Venditti M, Venturelli C, Ravasio V,Codeluppi M, Stefani S. Changing Italian nosocomial-community trends and heteroresistance in *Staphylococcus aureus* from bacteremia and endocarditis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(5):739-45.

Cano Garcia ME, Monteagudo Cimiano I, Mellado Encinas P, Ortega Álvarez C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in a patient with a wound infection. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014; http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.06.011.

CA-SFM, Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations (Edition de Janvier 2010). CA-SFM, 2010. Available from URL: http://www.sfm.asso.fr.

Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7:629-41.

Chan LC, Basuino L, Dip EC, Chambers HF. Comparative Efficacy of Tedizolid Phosphate (Prodrug of Tedizolid), Vancomycin and Daptomycin in a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(6):3252-6.

Chen Y, Koripella RK, Sanyal S, Selmer M. *Staphylococcus aureus* elongation factor G--structure and analysis of a target for fusidic acid. FEBS J 2010; 277(18):3789-803.

Chlebowicz MA, Bosch T, Sabat AJ, Arends JP, Grundmann H, van Dijl JM, Buist G. Distinction of Staphylococcal Cassette Chromosome mec type V elements from *Staphylococcus aureus* ST398. Int J Med Microbiol. 2013; 303(8):422-32.

Chlebowicz MA, Nganou K, Kozytska S, Arends JP, Engelmann S, Grundmann H, Ohlsen K, van Dijl JM, Buist G. Recombination between ccrC genes in a type V (5C2&5) staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) of*Staphylococcus aureus* ST398 leads to conversion

from methicillin resistance to methicillin susceptibility in vivo. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(2):783-91.

Cho I & Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. Nat Rev Genet. 2012; 13: 260-70.

Christiansen MT, Kaas RS, Chaudhuri RR, Holmes MA, Hasman H, Aarestrup FM. Genome-wide high-throughput screening to investigate essential genes involved in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 survival. PLoS One. 2014; 9(2):e89018.

Chua K, Laurent F, Coombs G, Grayson ML, Howden BP. Antimicrobial resistance: not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A clinician´s guide to community MRSA – its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. Clin. Infect. Dis. 2011; 52, 99-114.

Chua KY, Howden BP, Jiang JH, Stinear T, Peleg AY. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014; 21:554-62.

Chung WO, Werckenthin C, Schwarz S, Roberts MC. Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. J Antimicrob Chemother 1999; 43:5-14.

Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. Adv Microb Physiol 2006; 51:187-224.

CLSI, Clinical and Laboratory Standars Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.

Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food productions animals. Clin. Infect. Dis. 2009; 49, 132-141.

Conceição T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, Saret al. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(2):293-7.

Conceição T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, Sardinha T, Sancho L, de Sousa G, Machado Mdo C, de Lencastre H. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(2):293-7.

Conceição T, Diamantino F, Coelho C, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. Contamination of public buses with MRSA in Lisbon, Portugal: a possible transmission route of major MRSAclones within the community. PLoS One. 2013; 8(11):e77812.

Conceição T, Santos Silva I, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among patients and health care workers in São Tomé and Príncipe. Microb Drug Resist. 2014; 20(1):57-66.

Conceição T, Santos Silva I, de Lencastre H, Aires-de-Sousa M. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among patients and health care workers in São Tomé and Príncipe. Microb Drug Resist. 2014; 20(1):57-66.

Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. J Antimicrob Chemother 1998; 41:11-8.

Coque TM, Martínez JL. Grampositive pathogen clonal diversification and evolution: New perspectives in the XXI century. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:333–5.

Crago B, Ferrato C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. Food Microbiol. 2012; 32(1):202-5.

CRL-AR, Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance. Multiplex PCR for the detection of the *mecA* gene and the identification of *Staphylococcus aureus* National Food Insitute. Technical University of Denmark 2009.

Crombé F, Argudín MA, Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs. Front Microbiol. 2013; 4:57.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol 2001; 183: 2888-2896.

Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, Marín M, Bouza E; Grupo Español para el Estudio de Estafilococo. [*Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006)]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26:269-277.

Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M, Bouza E. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:4240-4245.

Cui S, Li J, Hu C, Jin S, Li F, Guo Y, Ran L, Ma Y. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. J Antimicrob Chemother 2009; 64:680-683.

Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. Int J Med Microbiol 2010; 300:109-117.

Cuny C, Köck R, Witte W. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. Int. J. Med. Microbiol. 2013; 303, 331-337.

Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany. PLoS One. 2011;6(9):e24360.

Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. PLoS One 2011; 6:e24360.

Cuny C, Nathaus R, Layer F, Strommenger B, Altmann D, Witte W. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. PLoS One 2009; 4:e6800.

Cuny C, Strommenger B, Witte W, Stanek C. Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. Microb Drug Resist 2008; 14:307-310.

Cuny C, Abdelbary M, Layer F, Werner G, Witte W. Prevalence of the immune evasion gene cluster in *Staphylococcus aureus* CC398. Vet Microbiol. 2015; 177(1-2):219-23.

Cuny C, Friedrich AW, Witte W. Absence of livestock-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus* clonal complex CC398 as a nasal colonizer of pigs raised in an alternative system. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(4):1296-7.

Cuny C, Layer F, Köck R, Werner G, Witte W. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) of clonal complex CC398, t571 from infections in humans are still rare in Germany. PLoS One. 2013; 8(12):e83165.

Daum RS. Removing the Golden Coat of *Staphylococcus aureus*. Department of Pediatrics, Section of Infectious Diseases, University of Chicago, Chicago, USA. N Engl J Med 2008; 359(1):85-7

David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev 2010; 23:616-687.

David MZ, Siegel J, Lowy FD, Zychowski D, Taylor A, Lee CJ, et al. Asymptomatic carriage of sequence type 398, spa type t571 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an urban jail: a newly emerging, transmissible pathogenic strain. J Clin Microbiol. 2013; 51:2443-7.

David MZ, Daum RS. Update on Epidemiology and Treatment of MRSA Infections in Children. Curr Pediatr Rep. 2013; 1(3):170-181.

Davies PR, Wagstrom EA, Bender JB. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. Emerg Infect Dis 2011; 17:1152-1153.

Davis JA, Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Brousse JH, Gustafson J, Kucher M. Carriage of methicillin-resistant staphylococci by healthy companion animals in the US. Lett Appl Microbiol. 2014; 59(1):1-8.

Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid 1999; 42(2):73-91.

Day SR, Moore CM, Kundzins JR, Sifri CD. Community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* virulence toward *Caenorhabditis elegans* compared. Virulence. 2012; 3(7):576-82.

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, van Oosterom RA, Vila A, Heuvelink AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. Int J Food Microbiol 2009; 134:52-56.

de Jonge R, Verdier JE, Havelaar AH. Prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst professional meat handlers in the Netherlands, March-July 2008. Euro Surveill. 2010; 15(46).

de Oliveira NE, Cardozo AP, Marques Ede A, dos Santos KR, Giambiagi-deMarval M. Interpretive criteria to differentiate low- and high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 2007; 56:937-939.

de Vries LE, Christensen H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet*(M) and identification of Tn*916*- and Tn*5801*-like (Tn*6014*) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. J Antimicrob Chemother 2009; 64:490-500.

Deiters C, Günnewig V, Friedrich AW, Mellmann A, Köck R. Are cases of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex (CC) 398 among humans still livestock-associated? Int J Med Microbiol. 2015; 305(1):110-3.

Deiters C, Günnewig V, Friedrich AW, Mellmann A, Köck R. Are cases of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex (CC) 398 among humans still livestock-associated? Int J Med Microbiol. 2015; 305(1):110-3.

DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. J Clin Invest. 2009 Sep;119(9):2464-74. doi: 10.1172/JCI38226.

DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2010; 375(9725):1557-68.

Demos M, McLeod MP, Nouri K. Recurrent furunculosis: a review of the literature. Br J Dermatol. 2012; 167(4):725-32.

Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H, Hallin M, Huysmans G, Garrino MG, Glupczynski Y, Malaviolle X, Vergison A, Struelens MJ. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*strains harbouring Panton-Valentine leucocidin genes in Belgium. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6):1103-6.

Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clin Infect Dis 2005; 40:562-573.

Deurenberg RH, Rijnders MI, Sebastian S, Welling MA, Beisser PS, Stobberingh EE. The *Staphylococcus aureus* lineage-specific markers collagen adhesin and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence typing clonal complexes within spa clonal complexes. Diagn Microbiol Infect Dis 2009b; 65:116-122.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Mol Med 2009a; 9: 100-115.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2008; 8:747-763.

Devriese LA, Van Damme LR, Fameree L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. Zentralbl Veterinarmed B 1972; 19:598-605.

Dibo I, Pillai SK, Gold HS, Baer MR, Wetzler M, Slack JL, Hazamy PA, Ball D, Hsiao CB, McCarthy PL Jr, Segal BH. Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from a cord blood transplant recipient. J Clin Microbiol 2004; 42:1843-1845.

Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2006; 367:731-739.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13:16-34.

Dominguez E, Zarazaga M, Torres C. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. J Clin Microbiol 2002; 40: 2638-41.

Domínguez MA, Coll P, Coque T, Vazquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC 2005.

Donnio PY, Février F, Bifani P, Dehem M, Kervégant C, Wilhelm N, Gautier-Lerestif AL, Lafforgue N, Cormier M; MR-MSSA Study Group of the Collège de Bactériologie-Virologie-Hygiène des Hôpitaux de France, Le Coustumier A. Molecular and epidemiological evidence for spread of multiresistant methicillin-susceptible Staphylococcusaureus strains in hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(12):4342-50.

Donskey JA. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin. Infect. 2004; Dis. 39, 219-226.

Dupeyron C, Campillo B, Bordes M, Faubert E, Richardet JP, Mangeney N. A clinical trial of mupirocin in the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a digestive disease unit. J Hosp Infect. 2002; 52(4):281-7.

EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Summary of latest data on antibiotic resistance in the European Union 2007-2013. Available at: http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx

EFSA, European Food Safety Authority. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission. EFSA J 2009a; 7:1376.

EFSA, European Food Safety Autority. Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. The EFSA J 2009b; 993:1-73.

Egyir B, Guardabassi L, Sørum M, Nielsen SS, Kolekang A, Frimpong E, Addo KK, Newman MJ, Larsen AR. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of clinical *Staphylococcus aureus* from healthcare institutions in Ghana. PLoS One. 2014; 25;9(2):e89716.

Eichenfield LF, Wynnis LT, Timothy GB, Alfons K, Paller AS, Schwarzenberger K, et al. Guidelines of care for management of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2014; 71:116-32.

Eichenfield LF, Wynnis LT, Timothy GB, Alfons K, Paller AS, Schwarzenberger K, James NB, Chamlin SL, Cohen DE, Cooper KD, Cordoro KM., Davis DM, Feldman SR, Hanifin JM et al. Guidelines of care for management of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol 2014; 71:116-32.

Ellington MJ, Yearwood L, Ganner M, East C, Kearns AM. Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from England and Wales. J Antimicrob Chemother 2008; 61:73-77.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, and Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2000; 38:1008-1015.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(11):7687-92.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. http://www.eucast.org

Everitt RG, Didelot X, Batty EM, Miller RR, Knox K, Young BC, Bowden R, Auton A, Votintseva A, Larner-Svensson H, Charlesworth J, Golubchik T,Ip CL, Godwin H, Fung R, Peto TE, Walker AS, Crook DW, Wilson DJ. Mobile elements drive recombination hotspots in the core genome of *Staphylococcus aureus*. Nat Commun. 2014; 5:3956.

Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, de Lencastre H. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol 2005; 43:1836-1842.

Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol Res. 2013; 69: 1–10.

Feßler AT, Kadlec K, Hassel M, Hauschild T, Eidam C, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. Appl Environ Microbiol 2011; 77:7151-7157.

Fitzgerald JR. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. Trends Microbiol. 2012; 20(4):192-8.

Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. Vet Dermatol. 2009; 20(5-6):456-70.

Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. Vet Dermatol. 2009; 20(5-6):456-70.

Franco A, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Stegger M, Pantosti A, et al. Molecular characterization of spa type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. J Antimicrob Chemother. 2011; 66:1231-5.

Franco A, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Stegger M, Pantosti A, Feltrin F, Ianzano A, Porrero MC, Liapi M, Battisti A. Molecular characterization of spa type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. J Antimicrob Chemother 2011; 66:1231-1235.

Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunol Rev 2008; 225:226-243.

Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. 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.

Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol 2005; 3:722-732.

Gallina S, Bianchi DM, Bellio A, Nogarol C, Macori G, Zaccaria T, Biorci F, Carraro E, Decastelli L. Staphylococcal poisoning foodborne outbreak: epidemiological investigation and strain genotyping. J Food Prot. 2013; 76(12):2093-8.

Garcia CP, Rosa JF, Cursino MA, Lobo RD, Mollaco CH, Gobara S, Malieno PB, Raymundo GF, Soares RE, Keil KG, Toma E, Salomão MC, Matté MH, Krebs VL, Gibelli MA, Kondo MM, Zugaib M, Costa SF, Levin AS. Non-multidrug-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal unit. Pediatr Infect Dis J. 2014; 33(10):e252-9.

García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11:595-603.

García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF,Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11:595-603.

García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. J Antimicrob Chemother 2014; 69:45-50.

Garcia-Graells C, Antoine J, Larsen J, Catry B, Skov R, Denis O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. Epidemiol. Infect. 2012; 140, 383-389.

Garcia-Graells C, van Cleef BA, Larsen J, Denis O, Skov R, Voss A. Dynamic of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in pig farm households: a pilot study. PLoS One. 2013; 8(5):e65512.

García-Lara J, Needham AJ, Foster SJ. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 43(3):311-23.

Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35(5):936-56.

Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, Lepe JA, Lagarde M, Ruiz de Gopegui E, Martínez JA, Montejo M, Torre-Cisneros J,Arnáiz A, Goenaga MA, Benito N, Rodríguez-Baño J, Pujol M; REIPI/GEIH Study Groups. Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2013a; 68(6):1423-30

Gasch O, Ayats J, Angeles Dominguez M, Tubau F, Liñares J, Peña C, Grau I, Pallarés R, Gudiol F, Ariza J, Pujol M. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infection: secular trends over 19 years at a university hospital. Medicine (Baltimore). 2011; 90(5):319-27.

Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, Molina J, Lopez-Medrano F, Ruiz E, Martinez JA, Bereciartua E, Rodriguez-Lopez F,Fernandez-Mazarrasa C, Goenaga MA, Benito N, Rodriguez-Baño J, Espejo E, Pujol M; REIPI/GEIH Study Groups. Predictive factors for mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus bloodstream infection: impact on outcome of host, microorganism and therapy. Clin Microbiol Infect. 2013b; 19(11):1049-57

Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, Martín-Gandul C, López-Medrano F, de Gopegui ER, Ramón Blanco J, García-Pardo G, Calbo E, Horcajada JP, Granados A, Jover-Sáenz A, Dueñas C, Pujol M; REIPI/GEIM Study Groups. Lack of association between genotypes and haematogenous seeding infections in a large cohort of patients withmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia from 21 Spanish hospitals. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(4):361-7.

Gelatti LC, Bonamigo RR, Inoue FM, Carmo MS, Becker AP, Castrucci FM, Pignatari AC, D' Azevedo PA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV in southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013; 46(1):34-8.

Geraci DM, Giuffrè M, Bonura C, Matranga D, Aleo A, Saporito L, Corsello G, Larsen AR, Mammina C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: a three-year prospective study in a neonatal intensive care unit in Italy. PLoS One. 2014; 5;9(2):e87760.

Gharsa, H., Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Gómez-Sanz, E., Lozano, C., Jouini, A., Klibi, N., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C. High diversity of genetic lineages and virulence genes in nasal *Staphylococcus aureus* isolates from donkeys destined to food consumption in Tunisia with predominance of the ruminant associated CC133 lineage. BMC Vet. Res. 2012; 8:203.

Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA, Othman N, Chong PP, van Belkum A, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Neela V. Predominance and emergence of clones of hospital acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. J Clin Microbiol 2010; 48:867-872.

Gilaberte Y, Sanmartín R, Aspiroz C, Hernandez-Martin A, Benito D, Sanz-Puertolas P, et al. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing children with atopic dermatitis. Pediatr Dermatol. 2014; doi: 10.1111/pde.12436.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Pie´mont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet 2002; 359:753-759.

Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, Bröker BM, Doskar J, Wolz C. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. J Bacteriol. 2009; 191(11):3462-8.

Golding GR, Bryden L, Levett PN, McDonald RR, Wong A, Wylie J, Graham MR, Tyler S, Van Domselaar G, Simor AE, Gravel D, Mulvey MR. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in humans, Canada. Emerg Infect Dis 2010; 16:587-594.

Gomes PL, Malavige GN, Fernando N, Mahendra MH, Kamaladasa SD, Seneviratne JK, et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic dermatitis in Sri Lanka. Clin Exp Dermatol. 2011; 36(2):195-200.

Gomes PL, Malavige GN, Fernando N, Mahendra MH, Kamaladasa SD, Seneviratne JK, et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic dermatitis in Sri Lanka. Clin Exp Dermatol. 2011; 36(2):195-200.

Gómez P, González-Barrio D, Benito D, García JT, Viñuela J, Zarazaga M *et al*. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. J Antimicrob Chemother 2014; 69(8):2061-4.

Gómez P, Lozano C, González-Barrio D, Zarazaga M, Ruiz-Fons F, Torres C. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the mecC gene in a semi-

extensive red deer (Cervus elaphus hispanicus) farm in Southern Spain. Vet Microbiol. 2015; 177(3-4):326-31.

Gómez-Gil R, Romero-Gómez MP, García-Arias A, Ubeda MG, Busselo MS, Cisterna R, Gutiérrez-Altés A, Mingorance J. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65:175-179.

Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. Foodborne Pathog Dis 2010; 7:1269-1277.

Gómez-Sanz E, Simón C, Ortega C, Gómez P, Lozano C, Zarazaga M, Torres C. First detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and Staphylococcus pseudintermedius ST68 from hospitalized equines in Spain. Zoonoses Public Health. 2014; 61(3):192-201.

Gómez-Sanz E, Simón C, Ortega C, Gómez P, Lozano C, Zarazaga M, Torres C. First detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and Staphylococcus pseudintermedius ST68 from hospitalized equines in Spain. Zoonoses Public Health. 2014; 61(3):192-201.

Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Zarazaga M. High diversity of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus pseudintermedius lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2013; 36(1):83-94.

Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Kadlec K, Schwarz S, Torres C. Chromosomal integration of the novel plasmid pUR3912 from methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 of human origin. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(11):E519-22.

Gong JQ, Lin L, Lin T, Hao F, Zeng FQ, Bi ZG, et al. Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial. Br J Dermatol. 2006; 155(4):680-7.

González-Domínguez M, Benito D, Sevil-Puras M, Aspiroz-Sancho C. Familial furunculosis associated with a multidrug resistance community clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) producer Panton Valentine leukocidin (PVL). Enferm Infec Microbiol Clin (in press).

González-Domínguez M, Seral C, Sáenz Y, Salvo S, Gude MJ, Porres-Osante N, Torres C, Castillo FJ. Epidemiological features, resistance genes, and clones among communityonset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CO-MRSA) isolates detected in northern Spain. Int J Med Microbiol. 2012;302:320–6.

González-Domínguez M, Seral C, Potel C, Constenla L, Algarate S, Gude MJ, Álvarez M, Castillo FJ. Antimicrobial resistance, virulence factors and genetic lineages of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates detected in a hospital in Zaragoza. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. pii: S0213-005X(15)00064-6.

Gopegui ER, Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Oliver A. Transferable multidrug resistance plasmid carrying *cfr* associated with *tet*(L), *ant*(4')-Ia, and *dfrK* genes from a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST125 strain. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:2139-2142.

Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clin Infect Dis 2008; 46:350-359.

Graveland H, Duim B, van Duijkeren E, Heederik D, Wagenaar JA. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. Int J Med Microbiol 2011a; 301:630-634.

Graveland H, Wagenaar JA, Bergs K, Heesterbeek H, Heederik D. Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact. PLoS One 2011b; 6:e16830.

Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, Mevius D, van Duijkeren E, Heederik D. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. PLoS One 2010; 5:e10990.

Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H, Prévost G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. FEBS Lett. 1998 Oct 2;436(2):202-8. Erratum in: FEBS Lett 1998 Dec 18;441(2):342.

Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C, Grunenberger F, Monteil H, Scheftel JM, Prévost G. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-lukD. J Clin Microbiol. 1999 Dec;37(12):4012-9.

Greendyke RM, Constantine HP, Magruder GB, Dean DC, Gardner JH, Morgan HR. Staphylococci on a medical ward, with special reference to fecal carriers. Am. J. Clin. Pathol. 1958; 30, 318-322.

Gries DM, Zemzars TF, Gibson KA, O'Hern E, Iyer M, Myers M, Pultz MJ, Li Y, Donskey CJ. A pilot study to assess frequency of carriage and routes of acquisition of *Staphylococcus aureus* by healthy infants. Am J Infect Control 2009; 37: 598-600.

Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. Infec Genet Evol 2013; pii: S1567-1348(13)00086-5.

Grun L. Studies on intestinal staphylococci. Arch. Hyg. Bakteriol. 1958; 142: 3-7.

Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. The Lancet 2006; 368:874-885.

Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW; European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. PLoS Med. 2010; 7(1):e1000215.

Gu FF, Hou Q, Yang HH, Zhu YQ, Guo XK, Ni YX, Han LZ. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Non-Native Patients with Skin and Soft Tissue Infections in Shanghai. PLoS One. 2015; 10(4):e0123557.

Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Smyth CJ, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. Genome Biol Evol 2010; 2:454-466.

Guzik TJ, Bzowska M, Kasprowicz A, Czerniawska-Mysik G, Wójcik K, Szmyd D, et al. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. Clin Exp Allergy 2005; 35(4):448-55.

Guzik TJ, Bzowska M, Kasprowicz A, Czerniawska-Mysik G, Wójcik K, Szmyd D, et al. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. Clin Exp Allergy 2005; 35(4):448-55.

Haenni M, Châtre P, Boisset S, Carricajo A, Bes M, Laurent F, Madec JY. Staphylococcal nasal carriage in calves: multiresistant Staphylococcus sciuri and immune evasion cluster (IEC) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(8):1927-8.

Hammerum AM, Jensen LB, Aarestrup FM. Detection of the *satA* gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus faecium* from food-animals. FEMS Microbiol Lett 1998; 168:145-151.

Hanson BM, Dressler AE, Harper AL, Scheibel RP, Wardyn SE, Roberts LK, Kroeger JS, Smith TC. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. J Infect Public Health 2011; 4:169-174.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46:8-20.

Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsan S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from minnesota dairy farms. J Clin Microbiol 2012; 50:688-695.

Harastani HH, Araj GF, Tokajian ST. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from a major hospital in Lebanon. Int J Infect Dis 2014; 19: 33-8.

Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Ulrich V. Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J Clin Microbiol 2003; 41:5442-5448.

Haroche J, Allignet J, Buchrieser C, El Solh N. Characterization of a variant of *vga*(A) conferring resistance to streptogramin A and related compounds. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:2271-2275.

Haroche J, Allignet J, El Solh N. Tn*5406*, a new staphylococcal transposon conferring resistance to streptogramin and related compounds including dalfopristin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:2337-2343.

Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J,Peacock SJ, Bentley SD. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. Science. 2010; 327(5964):469-74.

Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, Petersen A, Skov RL, Christensen JM, Bak Zeuthen A, Heltberg O, Harris SR, Zadoks RN, Parkhill J, Peacock SJ, Holmes MA. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel mecA homologue mecC. EMBO Mol Med. 2013; 5(4):509-15.

Harrison EM, Weinert LA, Holden MT, Welch JJ, Wilson K, Morgan FJ, Harris SR, Loeffler A, Boag AK, Peacock SJ, Paterson GK, Waller AS, Parkhill J, Holmes MA. A shared population of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 15 circulates in humans and companion animals. MBio. 2014; 5(3):e00985-13.

Hartman A, Tomasz B. Altered penicillin-binding-proteins in methicillin-resistant strains of S*taphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19:726-735.

Hasman H, Moodley A, Guardabassi L, Stegger M, Skov RL, Aarestrup FM. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. Vet Microbiol. 2010; 141(3-4):326-31.

Hayes V, Curtis NAC, Wyke AW, Ward JB. Decreased affinity of penicillin binding protein for β-lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. FEMS Microbiol Lett 1981; 10:119-122.

He W, Chen H, Zhao C, Zhang F, Li H, Wang Q, Wang X, Wang H. Population structure and characterisation of *Staphylococcus aureus* from bacteraemia at multiple hospitals in China: association between antimicrobial resistance, toxin genes and genotypes. Int J Antimicrob Agents. 2013; 42(3):211-9.

Hetem DJ, Bootsma MC, Troelstra A, Bonten MJ. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19, 1797-1802.

Hill SE, Yung A, Rademaker M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance in children with atopic dermatitis: a New Zealand experience. Australas J Dermatol. 2011; 52(1):27-31.

Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H. Mechanisms of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Ballière's Clin Infect Dis 1999; 5:221-242.

Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infect Chemother 2013; 45(2):117-36.

Ho PL, Chiu SS, Chan MY, Gan Y, Chow KH, Lai EL, Lau YL. Molecular epidemiology and nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* among young children attending day care centers and kindergartens in Hong Kong. J Infect. 2012; 64(5):500-6.

Huang JT, Abrams M, Tlougan B, Rademaker A, Paller AS. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. Pediatrics 2009; 123:e808–e814.

Hunt KM, Preuss J, Nissan C, Davlin CA, Williams JE, Shafii B, Richardson AD, McGuire MK, Bode L, McGuire MA. Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. Appl Environ Microbiol. 2008 78: 4763-70.

Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin Infect Dis 2001; 32:1608-1614.

Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I. The isoleucyl-tRNA synthetase mutation V588F conferring mupirocin resistance in glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* is not associated with a significant fitness burden. J Antimicrob Chemother 2004; 53:102-104.

Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, Jung WK, Kim JM, Park YH. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. Int J Food Microbiol 2007; 117:99-105.

ISFHH. Meticillin resistant *Staphylococcus aures* (MRSA), *Clostridium difficile* and ESBL-producing *Escherichia coli* in the home and community: assesing the problema, controlling the spread. 2006. An expert report commissioned by the International Scientific Forum on Home Hygiene.

Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:1323-1336.

Jamrozy DM, Fielder MD, Butaye P, Coldham NG. Comparative genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animals and humans. PLoS One. 2012; 7(7):e40458.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002; 70:631-641.

Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol 2001; 166:669-677.

JebaMercy G, Balamurugan K. Effects of sequential infections of *Caenorhabditis elegans* with *Staphylococcus aureus* and Proteus mirabilis. Microbiol Immunol. 2012; 56(12):825-35.

JebaMercy G, Pandian SK, Balamurugan K. Changes in *Caenorhabditis elegans* life span and selective innate immune genes during *Staphylococcus aureus*infection. Folia Microbiol (Praha). 2011; 56(5):373-80.

JebaMercy G, Prithika U, Lavanya N, Sekar C, Balamurugan K. Changes in *Caenorhabditis elegans* immunity and Staphylococcal virulence factors during their interactions. Gene. 2015; 558(1):159-72.

Jernigan JA, Pullen AL, Flowers L, Bell M, Jarvis WR. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24(6):409-14.

Jevons MP. Celbenine-resistant Staphylococci. BMJ 1961; 1:124-125.

Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists humans defensins by productions of staphylokinase, a novel bacterial evasión mechanism. J Immunol 2004; 172(2): 1169-76

Johler S, Giannini P, Jermini M, Hummerjohann J, Baumgartner A, Stephan R. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. Toxins (Basel). 2015; 7(3):997-1004.

Jones MB, Montgomery CP, Boyle-Vavra S, Shatzkes K, Maybank R, Frank BC, Peterson SN, Daum RS. Genomic and transcriptomic differences in community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*USA300 and USA400 strains. BMC Genomics. 2014 19; 15(1):1145.

Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2002; 8:82-84.

Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. J Antimicrob Chemother 2009b; 64:1156-1164.

Kadlec K, Feßler T, Hauschild T, Schwarz S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant*Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Infect 2012; 18:745-755.

Kadlec K, Pomba CF, Couto N, Schwarz S. Small plasmids carrying *vga*(A) or *vga*(C) genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. J Antimicrob Chemother 2010a; 65:2692-2698.

Kadlec K, Schwarz S. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet*(L). Antimicrob Agents Chemother 2009a; 53:776-778.

Kadlec K, Schwarz S. Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes *erm*(T), *dfrK*, and *tet*(L) in a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. Antimicrob Agents Chemother 2010b; 54:915-918.

Kadlec K, Schwarz S. Identification of the novel *dfrK*-carrying transposon Tn*559* in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain. Antimicrob Agents Chemother 2010c; 54:3475-3477.

Kadlec K, Schwarz S. Novel ABC transporter gene, *vga*(C), located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. Antimicrob Agents Chemother 2009c; 53:3589-3591.

Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, Reingold A, Gershman K, Ray SM, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Patel PR, Fridkin SK, Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators of the Emerging Infections Program. Healthcare-associated invasive MRSA infections, 2005-2008. JAMA 2010; 304:641-648.

Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci Biochnol Biochem 2004; 68(5):981-1003.

Katopodis GD, Grivea IN, Tsantsaridou AJ, Pournaras S, Petinaki E, Syrogiannopoulos GA. Fusidic acid and clindamycin resistance in community-associated, methicillin-resistant Staphylococcus aureusinfections in children of Central Greece. BMC Infect Dis. 2010; 10:351.

Kechrid A, Pérez-Vázquez M, Smaoui H, Hariga D, Rodríguez-Baños M, Vindel A, Baquero F, Cantón R, Del Campo R. Molecular analysis of community-acquired methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bacteraemic and osteomyelitis infections in children from Tunisia. Clin Microbiol Infect 2011; 17:1020-1026.

Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. Antimicrob. Agents Chemother 2007; 51:483-487.

Kehrenberg C, Cuny C, Strommenger 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.

Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. Mol Microbiol 2005; 57:1064-1073.

Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1156-1163.

Kehrenberg C, Schwarz S. Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn*558*. Antimicrob Agents Chemother 2005b; 49:813-815.

Kerouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, de Buyser ML. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. Int J Food Microbiol 2007; 115:369-375.

Kitai S, Shimizu A, Kawano J, Sato E, Nakano C, Uji T, Kitagawa H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. J Vet Med Sci 2005; 67:107-110.

Kitajima H. Prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in neonates. Pediatr Int. 2003; 45(2):238-45.

Klotz M, Zimmermann S, Opper S, Heeg K, Mutters R. Possible risk for re-colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by faecal transmission. Int J Hyg Environ Health. 2005; 208(5):401-5.

Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, van Leeuwen N, van Belkum A, Verbrugh H. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. J Clin Microbiol 1995; 33:1121-1128.

Ko J, Chung DR, Park SY, Baek JY, Kim SH, Kang CI, Peck KR, Lee NY, Song JH. First imported case of skin infection caused by PVL-positive ST30 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in a returning Korean traveler from the Philippines. J Korean Med Sci. 2013; 28(7):1100-2.

Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Köksal M, Jurke A, Becker K, Friedrich AW. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. PLoS One. 2013; 8(2):e55040.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:264-274.

Kong C, Tan MW, Nathan S. Orthosiphon stamineus protects *Caenorhabditis elegans* against *Staphylococcus aureus* infection through immunomodulation. Biol Open. 2014; 3(7):644-55.

Koyama H, Sanui M, Saga T, Harada S, Ishii Y, Tateda K, Lefor AK. A fatal infection caused by sequence type 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin gene: A case report in Japan. J Infect Chemother. 2015; 21(7):541-3.

Krupa P, Bystroń J, Bania J, Podkowik M, Empel J, Mroczkowska A. Genotypes and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from chicken and chicken meat in Poland. Poult Sci. 2014; 93(12):3179-86.

Krziwanek K, Metz-Gercek S, Mittermayer H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria. Emerg Infect Dis 2009; 15:766-769.

Krziwanek K, Metz-Gercek S, Mittermayer H. Trends in the occurrence of MRSA strains in Upper Austria from 2006 to 2009. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(6):920-3.

Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Höök M, Etienne J, Vandenesch F, Bowden MG. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science. 2007; 315(5815):1130-3.

Lamamy C, Berthelot A, Bertrand X, Valentin AS, Dos Santos S, Thiais S *et al*. CC9 livestock-associated *Staphylococcus aureus* emerges in bloodstream infections in French patients unconnected with animal farming. Clin Infect Dis 2013; 56(8):e83-6.

Lamaro-Cardoso J, de Lencastre H, Kipnis A, Pimenta FC, Oliveira LS, Oliveira RM, Nouer SS, Aires-de-Sousa M, Milheiriço C, Andrade AL. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *staphylococcus aureus* and methicillin-resistant S.aureus in infants attending day care centers in Brazil. J Clin Microbiol. 2009; 47(12):3991-7.

Larkin EA, Cartman RJ, Krabauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr MEd Chem 2009; 16: 4003-4019.

Layer F, Ghebremedhin B, König W, König B. Heterogeneity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains at a German University Hospital implicates the circulating-strain pool as a potential source of emerging methicillin-resistant *S. aureus* clones. J Clin Microbiol. 2006; 44(6):2179-85.

Lazenby GB, Soper DE, Beardsley W, Salgado CD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among women admitted for preterm delivery. Am J Obstet Gynecol. 2012; 206(4):329.e1-5.

Lebon A, Labout JA, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, van Wamel WJ, et al. Role of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in atopic dermatitis in infants: the Generation R Study. Arch Pediatr Adolesc Med. 2009; 163(8):745-9.

Lee HW, Kim SM, Kim JM, Oh BM, Kim JY, Jung HJ, et al. Potential immunoinflammatory role of staphylococcal enterotoxin A in atopic dermatitis: Immunohistopathological analysis and in vitro assay. Ann Dermatol. 2013; 25(2):173-80.

Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and the potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol 2003; 69:6489-6494.

Lee PK, Kreiswirth BN, Deringer JR, Projan SJ, Eisner W, Smith BL, Carlson E, Novick RP, Schlievert PM. Nucleotide sequences and biologic properties of toxic shock syndrome toxin 1 from ovine- and bovine-associated *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 1992; 165:1056-1063.

Lekkerkerk WS, van Wamel WJ, Snijders SV, Willems RJ, van Duijkeren E, Broens EM, Wagenaar JA, Lindsay JA, Vos MC. What is the origin of Livestock-associated MRSA CC398 isolates from humans without livestock contact: an epidemiological and genetic analysis. J Clin Microbiol. 2015

Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørum M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T. Novel types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* elements identified in Clonal Complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:3046-3050.

Li X, Sun J, Wu D, Wang L, Yang Y, Wang C, Liu L, Zhao C, Du P, Yu S, Shen X. Panton-Valentine leukocidin gene sequence variation and phage in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from children in mainland China. Microbiol Immunol. 2012 Mar;56(3):155-62. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00422.x.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29:1128-1132.

Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Aberg N, Wold AE. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. Clin Microbiol Infect. 2004a; 10(10):890-4.

Lindberg E, Adlerberth I, Wold AE. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* colonising the intestines of Swedish infants. J Clin Microbiol. 2004b; 42(2):530-4.

Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: superbug, super-genome?. Trends Microbiol 2004; 12:378-385.

Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 1998; 29:527-543.

Lindsay JA. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol 2010; 300:98-103.

Lo WT, Tang CS, Chen SJ, Huang CF, Tseng MH, Wang CC. Panton-Valentine leukocidin is associated with exacerbated skin manifestations and inflammatory response in children with community-associated staphylococcal scarlet fever. Clin Infect Dis 2009; 49:69-75.

Loncaric I, Künzel F, Licka T, Simhofer H, Spergser J, Rosengarten R. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses. Vet Microbiol. 2014; 168(2-4):381-7.

Loncaric I, Künzel F, Licka T, Simhofer H, Spergser J, Rosengarten R. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Austrian companion animals and horses. Vet Microbiol. 2014; 168(2-4):381-7.

López Furst MJ, de Vedia L, Fernández S, Gardella N, Ganaha MC, Prieto S, Carbone E, Lista N, Rotryng F, Morera GI, Mollerach M, Stryjewski ME; Grupo de Estudio de Infecciones de Piel y Estructuras Relacionadas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de la Comunidad, Sociedad Argentina de Infectología. Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. PLoS One. 2010; 8(11):e78303.

Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL, Weinert LA, Conway-Morris A, Cartwright RA, Simpson AJ, Rambaut A, Nübel U, Fitzgerald JR. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106:19545-19550.

Lozano C, Aspiroz C, Sáenz Y, Ruiz-García M, Royo-García G, Gómez-Sanz E. et al. Genetic environment and location of the *lnu*(A) and *lnu*(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. J Antimicrob Chemother 2012; 67, 2804-2808.

Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulance traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in

healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. Int J Med Microbiol 2011; 301, 500-505.

Lozano C, López M, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C, Zarazaga M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. J Antimicrob Chemoter 2009;64:1325-1326.

Lozano C, Rezusta A, Gómez P, Gómez-Sanz E, Báez N, Martin-Saco G. et al. High prevalence of *spa* types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother 2012b; 67, 330-334.

Lozano C, García-Migura L, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C, Aarestrup FM. Expansion of a plasmid classification system for Gram-positive bacteria and determination of the diversity of plasmids in *Staphylococcus aureus* strains of human, animal, and food origins. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(16):5948-55.

Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of lnu(A) gene. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(6):923-7.

Lozano C, Porres-Osante N, Crettaz J, Rojo-Bezares B, Benito D, Olarte I, Zarazaga M, Sáenz Y, Torres C. Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. J Infect Chemother. 2013; 19(2):233-42.

Lundell AC, Adlerberth , Lindberg E *et al.* Increased levels of circulating soluble CD14 but not CD83 in infants are associated with early intestinal colonization with *Staphylococcus aureus*. Clin Exp Allergy. 2007; 37:62-71.

Lundell AC, Hesselmar B, Nordström I, Saalman R, Karlsson H, Lindberg E, Aberg N, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. High circulating immunoglobulin A levels in infants are associated with intestinal toxigenic *Staphylococcus aureus* and a lower frequency of eczema. Clin Exp Allergy. 2009; 39:662-70.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci 1998; 95:3140-3145.

Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci 2010; 67:3057-3071.

Malik S, Coombs GW, O'Brien FG, Peng H, Barton MD. Molecular typing of methicillin-resistant staphylococci isolated from cats and dogs. J Antimicrob Chemother 2006; 58:428-431.

Mann NH. The potential of phages to prevent MRSA infections. Res Microbiol. 2008; 159(5):400-5.

Manzur A, Domínguez AM, Pujol M, González MP, Limon E, Hornero A, Martín R, Gudiol F, Ariza J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. Clin Microbiol Infect 2008; 14:377-380.

Margat E, Dargère S, Daurel C, Fines-Guyon M, Michon J, Verdon R, Cattoir V. [Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis due to the emerging Géraldine clone: a challenging microbiological diagnosis]. Med Mal Infect. 2013; 43(7):299-301.

Martín R, Langa S, Reviriego C et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends Food Sci Technol 2004; 15: 121-7.

Masiuk H, Kopron K, Grumann D, Goerke C, Kolata J, Jursa-Kulesza J, Giedrys-Kalemba S, Bröker BM, Holtfreter S. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine

leukocidin and the genetic background of*Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2010; 48(5):1527-35.

Masoud-Landgraf L, Johler S, Badura A, Feierl G, Luxner J, Wagner-Eibel U, Eber E, Zarfel G, Grisold AJ. Genetic and Phenotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Cystic Fibrosis Patients in Austria. Respiration. 2015; 89(5):390-5.

Matiz C, Tom WL, Eichenfield LF, Pong A, Friedlander SF. Children with atopic dermatitis appears less likely to be infected with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the San Diego experience. Pediatr Dermatol. 2011; 28:6-11.

Matussek A, Taipalensuu J, Einemo IM, Tiefenthal M, Löfgren S. Transmission of *Staphylococcus aureus* from maternity unit staff members to newborns disclosed through *spa* typing. Am J Infect Control 2007; 35: 122-5.

McCarthy AJ, Witney AA, Gould KA, Moodley A, Guardabassi L, Voss A, Denis O, Broens EM, Hinds J, Lindsay JA. The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country. Genome Biol Evol. 2011; 3:1164-74.

McCarthy AJ, Witney AA, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage: carriage and horizontal gene transfer is lineage associated. Front Cell Infect Microbiol. 2012; 2:6.

McCarthy, A.J., van Wamel, W., Vandendriessche, S., Larsen, J., Denis, O., Garcia-Graells, C. et al. *Staphylococcus aureus* CC398 clade associated with human-to-human transmission. Appl. Environ. Microbiol. 2012; 78, 8845-8848.

McLaws FB, Larsen AR, Skov RL, Chopra I, O'Neill AJ. Distribution of fusidic acid resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter 2011; 55(3):1173-6.

Mediavilla JR, Chen L, Uhlemann AC, Hanson BM, Rosenthal M, Stanak K, Koll B, Fries BC, Armellino D, Schilling ME, Weiss D, Smith TC, Lowy FD, Kreiswirth BN. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398, New York and New Jersey, USA. Emerg Infect Dis 2012; 18:700-702.

Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Curr Opin Microbiol. 2012; 15(5):588-95.

Mégevand C, Gervaix A, Heininger U, Berger C, Aebi C, Vaudaux B, Kind C, Gnehm HP, Hitzler M, Renzi G, Schrenzel J, François P. Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1414-1420.

Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Gold HS. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. J Infect Dis 2004; 190:311-317.

Melles DC, Tenover FC, Kuehnert MJ, Witsenboer H, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A. Overlapping population structures of nasal isolates of *Staphylococcus aureus* from healthy Dutch and American individuals. J Clin Microbiol 2008; 46:235-241.

Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. J Antimicrob Chemother 2010; 65:2329-2335.

Mendes RE, Smith TC, Deshpande L, Diekema DJ, Sader HS, Jones RN. Plasmid-borne *vga*(A)-encoding gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 recovered from swine and a swine farmer in the United States. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71:177-180.

Menegotto F, González-Cabrero S, Lorenzo B, Cubero Á, Cuervo W, Gutiérrez MP, Simarro M, Orduña A, Bratos MÁ. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital over a 4-year period: clonal replacement, decreased antimicrobial resistance, and identification of community-acquired and livestock-associated clones. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74(4):332-7.

Menestrina G, Dalla Serra M, Comai M, Coraiola M, Viero G, Werner S, Colin DA, Monteil H, Prévost G. Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett. 2003 Sep 18;552(1):54-60.

Mensa J, SorianoA, Llinares P, Barberan J, Montejo M, Salavert M, et al. Guidelines for antimicrobial treatment of the infection by *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter. 2013; 26 Suppl 1:1–84.

Miller K, Dunsmore CJ, Fishwick CW, Chopra I. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:1737-1742.

Miller MA, Dascal A, Portnoy J, Mendelson J. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. Infect Control Hosp Epidemiol 1996; 17:811-813.

Monaco M, Pedroni P, Sanchini A, Bonomini A, Indelicato A, Pantosti A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming. BMC Infect Dis. 2013; 13:258.

Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J,Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehricht R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One 2011; 6:e17936.

Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, *et al*. Detection of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in diseased European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *PLoS One* 2013; 8:e66166.

Monecke S, Ehricht R, Slickers P, Wernery R, Johnson B, Jose S, Wernery U. Microarray-based genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from camels. Vet Microbiol. 2011; 150(3-4):309-14.

Monecke S, Ehricht R, Slickers P, Wiese N, Jonas D. Intra-strain variability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains ST228-MRSA-I and ST5-MRSA-II. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28(11):1383-90.

Morel AS, Wu F, Della-Latta P, Cronquist A, Rubenstein D, Saiman L. Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a mother to her preterm quadruplet infants. Am J Infect Control. 2002; 30(3):170-3.

Moremi N, Mshana SE, Kamugisha E, Kataraihya J, Tappe D, Vogel U, Lyamuya EF, Claus H. Predominance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* -ST88 and new ST1797 causing wound infection and abscesses. J Infect Dev Ctries. 2012 Aug 21;6(8):620-5. doi: 10.3855/jidc.2093.

Morton TM, Johnston JL, Patterson J, Archer GL. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1272-1280.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

aureus: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol 2003; 41:1574-1585.

Murphy E. Inhibition of Tn*554* transposition: deletion analysis. Plasmid 1983; 10:260-269.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica 6º edición, Elsevier, 2009.

Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borchardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, Johnson SK, Vandenesch F, Fridkin S, O'Boyle C, Danila RN, Lynfield R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA. 2003; 290(22):2976-84.

Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, López JA, Martínez JL. Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(34):13728-31.

Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A, Struelens M, Devriese LA, Pasmans F, Haesebrouck F. Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:3817-3819.

Nester EW, Anderson DG, Evans Roberts C, Pearsall NN, Nester MT. Microbiology: A human perspective. 3rd ed. New York: McGraw Hill, 2001:820.

Nishifuji K, Sugai M, Amagai M. Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular sccissors" of bacteria that attacks the cutaneous defence barriers in mammals. J Dermatol Sci 2008; 49:21-31.

Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int J Food Microbiol 2007; 117:219-222.

Noto MJ, Archer GL. A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCC*mec* excision. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2782-2788.

Novak FR, Da Silva AV, Hagler AN, Figueiredo AM. Contamination of expressed human breast milk with an epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone. J Med Microbiol. 2000; 49(12):1109-17.

Novick R, Subedi A. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *staphylococcus*. Chem Immunol Allergy 2007; 93:42-57.

Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect 2001; 3:585-594.

Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 2003; 49:93-105.

Novick RP. Staphylococcal plasmids and their replication. Annu Rev Microbiol 1989; 43:537-565.

O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Gracey M, Moss F, Christiansen KJ, Grubb WB. Population dynamics of methicillin-susceptible and –resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. J Antimicrob Chemother 2009; 64:684-693.

O'Brian FG, Price C, Grubb WB, Gustafson JE. Genetic characterization of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101. J Antimicrob Chemother 2002; 50, 313-321.

Ogata K, Narimatsu H, Suzuki M, Higuchi W, Yamamoto T, Taniguchi H. [Molecular epidemiological study of community-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (CA-MRSA) - an examination of commercially distributed meat as a possible vehicle for CA-MRSA]. J UOEH. 2014 Sep 1;36(3):179-90.

OIE, World Organization for Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance. OIE international committee. 75th General Session, 2007 (Resolution No. XXVIII).

Okolie CE, Cockayne A, Penfold C, James R. Engineering of the LukS-PV and LukF-PV subunits of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin for diagnostic and therapeutic applications. BMC Biotechnol 2013; 13:103.

Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis 2002; 2:180-189.

Oliveira DC, Tomaz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis 2002; 2(3): 180-9.

O'Neill AJ, Bostock JM, Moita AM, Chopra I. Antimicrobial activity and mechanisms of resistance to cephalosporin P1, an antibiotic related to fusidic acid. J Antimicrob Chemother 2002; 50:839-848.

O'Neill AJ, McLaws F, Kahlmeter G, Henriksen AS, Chopra I. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:1737-1740.

Ortega E, Abrioul H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of *staphylococcus aureus* enterotoxins: Pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins 2010; 2:2117-2131.

Otter JA, French GL. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the case for a genotypic definition. J Hosp Infect. 2012; 81(3):143-8.

Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Lancet Infect Dis. 2010; 10(4):227-39.

Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(7):670-6.

Panton P., Valentine F. Staphylococcal toxins. Lancet. 1932; 222:506-8.

Pantosi A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. Front Microbiol 2012; 3:127.

Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2014; 22:42-7.

Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2014; 22:42-7.

Pepe O, Blaiotta G, Bucci F, Anastasio M, Aponte M, Villani F. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(11):7057-62.

Pérez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? Pediatrics. 2007; 119: e724–32.

Pérez-Roth E, Kwong SM, Alcoba-Florez J, Firth N, Méndez-Alvarez S. Complete nucleotide sequence and comparative analysis of pPR9, a 41.7-kilobase conjugative staphylococcal multiresistance plasmid conferring high-level mupirocin resistance. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:2252-2257.

Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. J Clin Microbiol 2004; 42:4649-4656.

Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J; EARSS Spain spa-typing Group. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the

aminoglycoside-modifying enzyme gene ant(4')-Ia and the efflux pump genes msrA/msrB. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(1):21-31.

Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK *et al*. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. Clin Microbiol Infect 2013; 19(1):E16-22.

Petry V, Bessa GR, Poziomczyck CS, Oliveira CF, Weber MB, Bonamigo RR, et al. Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. An Bras Dermatol. 2012; 87(5):729-34.

Petternel C, Galler H, Zarfel G, Luxner J, Haas D, Grisold AJ, Reinthaler FF, Feierl G. Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. Food Microbiol. 2014; 44:41-6.

Pilla R, Castiglioni V, Gelain ME, Scanziani E, Lorenzi V, Anjum M, Piccinini R. Long-term study of MRSA ST1, t127 mastitis in a dairy cow. Vet Rec 2012; 170:312.

Pinter DM, Mandel J, Hulten KG, Minkoff H, Tosi MF. Maternal-infant perinatal transmission of methicillin-resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. Am J Perinatol. 2009; 26(2):145-51.

Pomba C, Hasman H, Cavaco LM, da Fonseca JD, Aarestrup FM. First description of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. Int J Antimicrob Agents 2009; 34:193-194.

Porrero MC, Harrison EM, Fernández-Garayzábal JF, Paterson GK, Díez-Guerrier A, Holmes MA *et al*. Detection of *mecC*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. Env Microb Repor 2014b; doi:10.1111/1758-2229.12191.

Porrero MC, Hasman H, Vela AI, Fernández-Garayzábal JF, Domínguez L, Aarestrup FM. Clonal diversity of *Staphylococcus aureus* originating from the small ruminants goats and sheep. Vet Microbiol 2012; 156(1-2):157-61.

Porrero MC, Valverde A, Fernández-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, Lavín S *et al*. *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. Emerg Infect Dis 2014; 20(5):899-901.

Postma B, Poppelier MJ, van Galen JC, Prossnitz ER, van Strijp JA, de Haas CJ, van Kessel KP. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. J Immunol 2004; 172(11):6994-7001.

Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, Monteil H, Piemont Y.Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. J Med Microbiol 1995; 42(4):237-45.

Price L B, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. Mbio 2012; 3: e00305-11.

Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, Pearson T, Waters AE, Foster JT, Schupp J, Gillece J, Driebe E, Liu CM, Springer B, Zdovc I,Battisti A, Franco A, Zmudzki J, Schwarz S, Butaye P, Jouy E, Pomba C, Porrero MC, Ruimy R, Smith TC, Robinson DA, Weese JS, Arriola CS, Yu F, Laurent F,Keim P, Skov R, Aarestrup FM. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio 2012; 3:pii: e00305-11.

Prokesová L, Porwit-Bóbr Z, Baran K, Potempa J, Pospísil M, John C. Effect of metalloproteinase from *Staphylococcus aureus* on in vitro stimulation of human lymphocytes. Immunol. Lett. 1991; 27, 225-230.

Pu S, Han F, Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Lousiana retail meats. Appl Environ Microbiol 2009; 75:265-267.

Rahimpour R, Mitchell G; Khandaker MH, Kong C, Singh B, Xu L, Ochi A, Feldman RD, Pickering JG, Gill BM, Kelvil DJ. Bacterial superantigens induce down-midulations of CC chemokine responsiveness in human monocytes via aternative chemokin e ligand-independent mechanism. J immunol 1999; 162(4):2299-307.

Rasigade JP, Laurent F, Hubert P, Vandenesch F, Etienne J. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. Emerg Infect Dis 2010; 16:1330.

Rasmussen G, Monecke S, Brus O, Ehricht R, Söderquist B. Long term molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia isolates in Sweden. PLoS One. 2014; 9(12):e114276.

Rasschaert G, Vanderhaeghen W, Dewaele I, Janez N, Huijsdens X, Butaye P, Heyndrickx M. Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398. J. Clin Microbiol 2009; 47:3313-3322.

Redinbo MR. The microbiota, chemical symbiosis, and human disease. J Mol Biol. 2014; 426(23):3877-91.

Reusch M, Ghosh P, Ham C, Klotchko A, Singapuri S, Everett G. Prevalence of MRSA colonization in peripartum mothers and their newborn infants. Scand J Infect Dis. 2008; 40(8):667-71.

Reynolds PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis . 1989; 8(11):943-50.

Rivero-Pérez B, Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S. Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Tenerife Island, Spain. Infect Genet Evol. 2012; 12(3):586-90.

Robert J, Tristan A, Cavalié L, Decousser JW, Bes M, Etienne J, Laurent F; ONERBA Observatoire National de l'Epidémiologie de Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. Panton-valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:1734-1739.

Roberts AP, Chandler M, Courvalin P, Guédon G, Mullany P, Pembroke T, Rood JI, Smith CJ, Summers AO, Tsuda M, Berg DE. Revised nomenclature for transposable genetic elements. Plasmid 2008; 60:167-173.

Rodriguez M, Snoek LB, De Bono M, Kammenga JE. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. Trends Genet. 2013; 29(6):367-74.

Rojo A, Aguinaga A, Monecke S, Yuste JR, Gastaminza G, España A. *Staphylococcus aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: may factors other than superantigens be involved? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33:651-8.

Romero-Gómez MP, Mora-Rillo M, Lázaro-Perona F, Gómez-Gil MR, Mingorance J. Bacteremia due to meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in a patient with urothelial carcinoma. J Med Microbiol 2013; 62:1914-6.

Rooijakkers SH, van Kessel KP, van Strijp AG. Staphylococcal innate immune evasion. Trends Microbiol 2005; 13: 596-601.

Rooijakkers SH, van Kessel KP, van Strijp JA. Staphylococcal innate immune evasion. Trends Microbiol 2005; 13(12):596-601.

Rooijakkers SH, van Strijp JA. Bacterial complement evasion. Mol Immunol 2007; 44(1-3):23-32.

Rosenthal ME, Mediavilla J, Chen L, Sonnenfeld J, Pierce L, Shannon A, Boucher H, Pearlmutter M, Kreiswirth B, Kuo YH, Previl H, Rojtman A. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in post-earthquake northern Haiti. Int J Infect Dis. 2014; 29:146-51.

Rozenbaum R, Sampaio MG, Batista GS, Garibaldi AM, Terra GM, Souza MJ, Vieira EN, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Figueiredo AM. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Braz J Med Biol Res. 2009; 42(8):756-60.

Ruimy R, Maiga A, Armand-Lefevre L, Maiga I, Diallo A, Koumaré AK, Ouattara K, Soumaré S, Gaillard K, Lucet JC, Andremont A, Feil EJ. The carriage population of *Staphylococcus aureus* from Mali is composed of a combination of pandemic clones and the divergent Panton-Valentine leukocidin-positive genotype ST152. J Bacteriol. 2008; 190(11):3962-8.

Ruiz-Díez B, Sánchez P, Baquero F, Martínez JL, Navas A. Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*-Pseudomonas aeruginosa pathogenesis model. J Theor Biol. 2003; 225(4):469-76.

Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, Kasprowicz A, Sekowska A, van Den Burg B, Travis J, Potempa J. Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 2000; 68: 973-976.

Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Ohtsuka M, Hongo I, Fukata T *et al*. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. J Clin Microbiol 2012; 50(6):2152-5.

Saunders A, Panaro L, McGeer A, Rosenthal A, White D, Willey BM, Gravel D, Bontovics E, Yaffe B, Katz K. A nosocomial outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy newborns and postpartum mothers. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2007; 18(2):128-32.

Schaumburg F, Ngoa UA, Kösters K, Köck R, Adegnika AA, Kremsner PG, Lell B, Peters G, Mellmann A, Becker K. Virulence factors and genotypes of *Staphylococcus aureus* from infection and carriage in Gabon. Clin Microbiol Infect 2011; 17:1507-1513.

Schaumburg F, Alabi AS, Mombo-Ngoma G, Kaba H, Zoleko RM, Diop DA, Mackanga JR, Basra A, Gonzalez R, Menendez C, Grobusch MP, Kremsner PG,Köck R, Peters G, Ramharter M, Becker K. Transmission of *Staphylococcus aureus* between mothers and infants in an African setting. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(6):O390-6.

Schaumburg F, Köck R, Mellmann A, Richter L, Hasenberg F, Kriegeskorte A, Friedrich AW, Gatermann S, Peters G, von Eiff C, Becker K; study group. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. J Clin Microbiol. 2012; 50(10):3186-92.

Schlotter K, Ehricht R, Hotzel H, Monecke S, Pfeffer M, Donat K. Leukocidin genes lukF-P83 and lukM are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. Vet Res 2012; 43: 42.

Schmitz F.J., Hofmann B., Hansen B., Scheuring S., Luckefahr M., Klootwijk M. Verhoef J, Fluit A, Heinz HP, Köhrer K, Jones ME. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1998; 41:481-484.

Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, Verhoef J, Fluit AC. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. J Antimicrob Chemother 2000; 45:891-894.

Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, Thomann A, Straub R, Perreten V. Presence of new *mecA* and *mph*(C) variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. J Clin Microbiol 2006; 44:4444-4454.

Schwarz S, Fessler AT, Hauschild T, Kehrenberg C, Kadlec K. Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in staphylococci. Ann N Y Acad Sci. 2011; 1241:82-103.

Schwendener S, Perreten V. New transposon Tn*6133* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 contains *vga*(E), a novel streptogramin A, pleuromutilin, and lincosamide resistance gene. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:4900-4904.

Seah C, Alexander DC, Louie L, Simor A, Low DE, Longtin J, Melano RG. MupB, a new high-level mupirocin resistance mechanism in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter 2012; 56(4):1916-20.

Seidl K, Leimer N, Palheiros Marques M, Furrer A, Holzmann-Bürgel A, Senn G, Zbinden R, Zinkernagel AS. Clonality and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the university hospital Zurich, Swizerland between 2012 and 2014. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015; 14:14.

Shittu A, Oyedara O, Abegunrin F, Okon K, Raji A, Taiwo S, Ogunsola F, Onyedibe K, Elisha G. Characterization of methicillin-susceptible and -resistant staphylococci in the clinical setting: a multicentre study in Nigeria. BMC Infect Dis. 2012; 2;12:286.

Shopsin B, Gómez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin- esistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 2000a; 38:3453-3456.

Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J Clin Microbiol 2003; 41:456-459.

Shopsin B, Mathema B, Martinez J, Ha E, Campo ML, Fierman A, Krasinski K, Kornblum J, Alcabes P, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. J Infect Dis 2000b; 182:359-362.

Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55:3765-3773.

Shore AC, Tecklenborg SC, Brennan GI, Ehricht R, Monecke S, Coleman DC. Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Ireland from 2002 to 2011: 21 clones, frequent importation of clones, temporal shifts of predominant methicillin-resistant *S. aureus* clones, and increasing multiresistance. J Clin Microbiol. 2014; 52(3):859-70.

Shore AC, Rossney AS, O'Connell B, Herra CM, Sullivan DJ, Humphreys H, Coleman DC. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec-associated DNA segments in multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and identification of Staphylococcus epidermidis ccrAB4 in bothmethicillin-resistant *S. aureus* and MSSA. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(12):4407-19.

Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Infect Immun. 2003; 71(4):2208-17.

Sim K, Powell E, Shaw AG, McClure Z, Bangham M, Kroll JS. The neonatal gastrointestinal microbiota: the foundation of future health?. Arch Dis Child Fetal Neonatal. 2013; 98: 362-64.

Sinha A, Rae R, Iatsenko I, Sommer RJ. System wide analysis of the evolution of innate immunity in the nematode model species *Caenorhabditis elegans*and Pristionchus pacificus. PLoS One. 2012; 7(9):e44255.

Skov R, Larsen AR, Kearns A, Holmes M, Teale C, Edwards G, Hill R. Phenotypic detection of mecC-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. J Antimicrob Chemother 2014; 69(1):133-5

Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, Capuano AW, Herwaldt LA, Diekema DJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. PLoS One 2008; 4:e4258.

Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Feßler AT, Gilbert FB, Kadlec K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Treilles M, Pourcel C, Vergnaud G. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. PLoS One. 2012; 7(5):e33967.

Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR, Yeom JS, Kim SW, Chang HH, Kim YS, et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP Study. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1061-9.

Song M, Bai Y, Xu J, Carter MQ, Shi C, Shi X. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. Int J Food Microbiol. 2015; 195:1-8.

Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. *erm*(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother 2004; 53:814-817.

Squier C, Rihs JD, Risa KJ, Sagnimeni A, Wagener MM, Stout J, Muder RR, Singh N. *Staphylococcus aureus* rectal carriage and its association with infections in patients in a surgical intensive care unit and a liver transplant unit. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002; 23(9):495-501.

Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. Int J Antimicrob Agents 2012; 39(4):273-82.

Stegger M, Lindsay JA, Sørum M, Gould KA, Skov R. Genetic diversity in CC398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of different geographical origin. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(7):1017-9.

Stegger M, Wirth T, Andersen PS, Skov RL, De Grassi A, Simões PM, Tristan A, Petersen A, Aziz M, Kiil K, Cirković I, Udo EE, del Campo R, Vuopio-Varkila J, Ahmad N, Tokajian S, Peters G, Schaumburg F, Olsson-Liljequist B, Givskov M, Driebe EE, Vigh HE, Shittu A, Ramdani-Bougessa N, Rasigade JP, Price LB, Vandenesch F, Larsen AR, Laurent F. Origin and evolution of European community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. MBio. 2014; 5(5):e01044-14.

Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. Br Med J 1963; 5326:308-311.

Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. Microbiology 2008; 154:1949-1959.

Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:2562-2566.

Suzuki Y, Kubota H, Sato'o Y, Ono HK, Kato R, Sadamasu K, Kai A, Kamata Y. Identification and characterization of novel *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands encoding staphylococcal enterotoxins originating from staphylococcal food poisoning isolates. J Appl Microbiol. 2015; 118(6):1507-20.

Tang CS, Wang CC, Huang CF, Chen SJ, Tseng MH, Lo WT. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis. Pediatr Int. 2011; 53(3):363-7.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33:2233-2239.

Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. J Antimicrob Chemother 2009; 64:441-446.

Tewhey R, Gu B, Kelesidis T, Charlton C, Bobenchik A, Hindler J, Schork NJ, Humphries RM. Mechanisms of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci determined by whole-genome sequencing. MBio. 2014; 5(3):e00894-14.

Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, Enright MC. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Microbiol 2007; 45:616-619.

Thompson T, Brown PD. Comparison of antibiotic resistance, virulence gene profiles, and pathogenicity of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. Pathog Glob Health. 2014; 108(6):283-91.

Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. Lancet 1978; 2:1116-1118.

Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. Exp Biol Med (Maywood) 2001; 226:164-176.

Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B. Novick RP. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Microbiology 2008; 154:2265-74.

Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. Pol J Microbiol 2011; 60:95-103.

Udo EE, Al-Sweih N, Noronha BC. A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. J Antimicrob Chemother 2003; 51:1283-1286.

Udo EE, Pearman JW, Grubb WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. J Hosp Infect 1993; 25:97-108.

Udo EE, Sarkhoo E. The dissemination of ST80-SCCmec-IV community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone in Kuwait hospitals. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010 Nov 4;9:31. doi: 10.1186/1476-0711-9-31.

Uehara Y, Kikuchi K, Nakamura T, Nakama H, Agematsu K, Kawakami Y, Maruchi N, Totsuka K. H(2)O(2) produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. Clin Infect Dis. 2001; 32(10):1408-13. Epub 2001 Apr 17.

Ugolotti E, Bandettini R, Marchese A, Gualco L, Vanni I, Borzi L, Di Marco E, Castagnola E, Melioli G, Biassoni R. Molecular characterization of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in pediatric outbreaks using variable tandem repeat analysis with spa and ClfB typing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 69(2):213-7.

Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, Deleo FR. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol.2014; pii: S1567-1348(13)00179-2.

Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, Barbian KD, McCarthy AJ, Street C, Hirschberg DL, Lipkin WI, Lindsay JA, DeLeo FR,Lowy FD. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. MBio 2012; 3:pii:e00027-12.

Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, Sullivan SB, Hafer C, Kennedy AD, Barbian KD, McCarthy AJ, Street C, Hirschberg DL, Lipkin WI, Lindsay JA, DeLeo FR, Lowy FD. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. MBio. 2012; 3(2).

Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, DeLeo FR. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014; 21:563-74.

Vainio A, Koskela S, Virolainen A, Vuopio J, Salmenlinna S. Adapting spa typing for national laboratory-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(6):789-97.

van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrugh HA. Coevolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aueus*. Infect Genet Evol 2009; 9:32-47.

van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, van Leeuwen WB, van Duijkeren E, Huijsdens XW, Spalburg E, de Neeling AJ, Verbrugh HA; Dutch Working Party on Surveillance and Research of MRSA-SOM. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. Emerg Infect Dis 2008; 14:479-483.

Van Cleef BA, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Züchner L, Van Benthem BH, Kluytmans JA, Mulders MN, Van De Giessen AW. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. Epidemiol Infect. 2010; 138(5):756-63.

van Cleef BA, van Benthem BH, Haenen AP, Bosch T, Monen J, Kluytmans JA. Low incidence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in The Netherlands in 2009. PLoS One. 2013; 8(8):e73096.

van de Klundert JAM, Vliegenthart JS. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, and White TJ (eds.). American Society for Microbiology 1993:547-552.

Van den Eede A, Martens A, Lipinska U, Struelens M, Deplano A, Denis O, Haesebrouck F, Gasthuys F, Hermans K. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. Vet Microbiol 2009; 133:138-144.

van Loo IH, Diederen BM, Savelkoul PH, Woudenberg JH, Roosendaal R, van Belkum A, Lemmens-den Toom N, Verhulst C, van Keulen PH, Kluytmans JA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. Emerg Infect Dis 2007b; 13:1753-1755.

van Rijen MM, Bosch T, Heck ME, Kluytmans JA. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and transmission in a Dutch hospital. J Hosp Infect 2009; 72:299-306.

Van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. J Bacteriol 2006; 188, 1310-1315.

VanCleef BA, Monnet DL, Voss A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17, 502-505.

Vandendriessche S, Kadlec K, Schwarz S, Denis O. Methicillin susceptible Staphylococcus aureus ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene erm(T) in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 2455–9.

Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Larsen J, de Mendonça R, Hallin M, Butaye P, Hermans K, Haesebrouck F, Denis O. High genetic diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from humans and animals on livestock farms and presence of SCCmec remnant DNA in MSSA CC398. J Antimicrob Chemother 2014; 69(2):355-62.

Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Soares FV, Hallin M, Catry B, Hermans K, Butaye P, Haesebrouck F, Struelens MJ, Denis O. Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. J Antimicrob Chemother. 2013; 68(7):1510-6.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant

Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003; 9:978-984.

Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Vet Microbiol 2010a; 144:166-171.

Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. Epidemiol Infect 2010b; 138:606-625.

Vautor E, Abadie G, Pont A, Thiery R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal species. Vet Microbiol. 2008; 18;127, 407-11.

Velasco C, López-Cortés LE, Caballero FJ, Lepe JA, de Cueto M, Molina J, Rodríguez F, Aller AI, García Tapia AM, Pachón J, Pascual A, Rodríguez-Baño J;SAEI/SAMPAC MRSA-BSI Group. Clinical and molecular epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in Southern Spain. J Hosp Infect. 2012; 81(4):257-63.

Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Héchard Y. delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. Peptides. 2009; 30(4):817-23. doi: 10.1016/j.peptides.2008.12.017.

Verkade E, Bosch T, Hendriks Y, Kluytmans J. Outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch nursing home. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 2012; 33, 624-626.

Verkade E, Bergmans AM, Budding AE, van Belkum A, Savelkoul P, Buiting AG, Kluytmans J. Recent emergence of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 in human blood cultures. PLoS One. 2012; 7(10):e41855.

Verkade E, Kluytmans-van den Bergh M, van Benthem B, van Cleef B, van Rijen M, Bosch T, Schouls L, Kluytmans J. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 from livestock veterinarians to their household members. PLoS One. 2014 Jul; 9(7):e100823.

Verstappen KM, Duim B, van Nes A, Snijders S, van Wamel WJ, Wagenaar JA. Experimental nasal colonization of piglets with methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol. 2014; 174(3-4):483-8.

Vesterlund S, Karp M, Salminen S, Ouwehand AC. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. Microbiology. 2006; 152(Pt 6):1819-26.

Vincze S, Stamm I, Kopp PA, Hermes J, Adlhoch C, Semmler T, Wieler LH, Lübke-Becker A, Walther B. Alarming proportions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companionanimals, Germany 2010-2012. PLoS One. 2014; (1):e85656.

Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, Trincado P, Boquete T, Pérez-Vázquez M, Marín M, Bouza E; Spanish Group for the Study of Staphylococcus. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. J Clin Microbiol. 2009; 47(6):1620-7.

Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(11):2913-9.

Vitale M, Scatassa ML, Cardamone C, Oliveri G, Piraino C, Alduina R, Napoli C. Staphylococcal food poisoning case and molecular analysis of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food in Sicily, Italy. Foodborne Pathog Dis. 2015; 12(1):21-3.

Vogel V, Falquet L, Calderon-Copete SP, Basset P, Blanc DS. Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital. PLoS One. 2012; 7(6):e38969.

Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg Infect Dis 2005; 11:1965-1966.

Wagner A. Cooperation is fleeting in the world of transposable elements. PLoS Comput Biol. 2006; 2(12):e162.

Wassenberg MW, Bootsma MC, Troelstra A, Kluytmans JA, Bonten MJ. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. Clin Microbiol Infect 2011; 17, 316-319.

Wassenberg MW, Bootsma MC, Troelstra A, Kluytmans JA, Bonten MJ. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. Clin Microbiol Infect 2011; 17:316-319.

Weese JS, Reid-Smith R, Rousseau J, Avery B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of retail pork. Can Vet J 2010a; 51:749-752.

Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Oberg S, Karlsson L, Ahrén C. Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. Emerg Infect Dis 2008; 14:1271-1272.

Wendlandt S, Schwarz S, Silley P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen? Annu Rev Food Sci Technol 2013;4:117-139.

Wettstein Rosenkranz K, Rothenanger E, Brodard I, Collaud A, Overesch G, Bigler B, Marschall J, Perreten V. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among Swiss veterinary health care providers: detection of livestock- and healthcare-associated clones. Schweiz Arch Tierheilkd. 2014; 156(7):317-25.

Wiese-Posselt M, Heuck D, Draeger A, Mielke M, Witte W, Ammon A, et al. Successful termination of a furunculosis outbreak due to lukSlukF-positive, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a German village by stringent decolonization, 2002-2005. Clin Infect Dis. 2007; 44: e88–95.

Williams R.O. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Bacteriol. 1963; Rev. 27, 56.

Williamson DA, Bakker S, Coombs GW, Tan HL, Monecke S, Heffernan H. Emergence and molecular characterization of clonal complex 398 (CC398) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in New Zealand. J. Antimicrob. Chemother 2014; 69, 1428-1430.

Williamson DA, Roberts SA, Ritchie SR, Coombs GW, Fraser JD, Heffernan H. Clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in New Zealand: rapid emergence of sequence type 5 (ST5)-SCCmec-IV as the dominant community-associated MRSA clone. PLoS One. 2013; 8(4):e62020.

Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. Emerg Infect Dis 2007; 13:255-258.

Wondrack L, Massa M, Yang BV, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:992-998.

Wong H, Louie L, Lo RY, Simor AE. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with a partial or complete absence of staphylococcal cassette chromosome elements. J Clin Microbiol. 2010; 48(10):3525-31.

Wright JS 3rd, Traber KE, Corrigan R, Benson SA, Musser JM, Novick RP. The *agr* radiation: an early event in the evolution of staphylococci. J Bacteriol 2005; 187:5585-5594.

Wu D, Wang Q, Yang Y, Geng W, Wang Q, Yu S, et al. Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 67(1):1-8.

Wu K, Conly J, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Zhang K. *Caenorhabditis elegans* as a host model for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(3):245-54.

Wu SW, de Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus.* J Bacteriolog 2001; 183:2417-2424.

Wu K, Simor AE, Vearncombe M, McClure JA, Zhang K. A *Caenorhabditis elegans* host model correlates with invasive disease caused by *Staphylococcus aureus*recovered during an outbreak in neonatal intensive care. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2012; 23(3):130-4.

Wu K, Zhang K, McClure J, Zhang J, Schrenzel J, Francois P, Harbarth S, Conly J. A correlative analysis of epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcusaureus clones from diverse geographic locations with virulence measured by a *Caenorhabditis elegans* host model. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32(1):33-42.

Wulf M, Voss A. MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen? Clin Microbiol Infect 2008; 14:519-521.

Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H, Sugai M. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. Infect Immun 2001; 69:7760-7771.

Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M, Fudaba Y, Aepfelbacher M, Takata T, Ohara M, Komatsuzawa H, Amagai M, Sugai M. Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect Immun 2002; 70:5835-5845.

Yamaguchi T, Okamura S, Miura Y, Koyama S, Yanagisawa H, Matsumoto T. Molecular Characterization of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin and Pus Samples of Outpatients in Japan. Microb Drug Resist. 2015; 21(4):441-7

Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J Biol Chem 2002; 277:13138-13147.

Yeung M, Balma-Mena A, Shear N, Simor A, Pope E, Walsh S, McGavin MJ. Identification of major clonal complexes and toxin producing strains among *Staphylococcus aureus* associated with atopic dermatitis. Microbes Infect 2011; 13(2):189-97.

Yun HS, Heo JH, Son SJ, Park MR, Oh S, Song MH, Kim JN, Go GW, Cho HS, Choi NJ, Jo SW, Jeong DY, Kim Y. Bacillus licheniformis isolated from Korean traditional food sources enhances the resistance of *Caenorhabditis elegans* to infection by *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Biotechnol. 2014; 24(8):1105-8.

Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. Lancet Infect Dis 2005; 5:275-286.

Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β-lactams in staphylococci. Science 2001; 291:1962-1965.

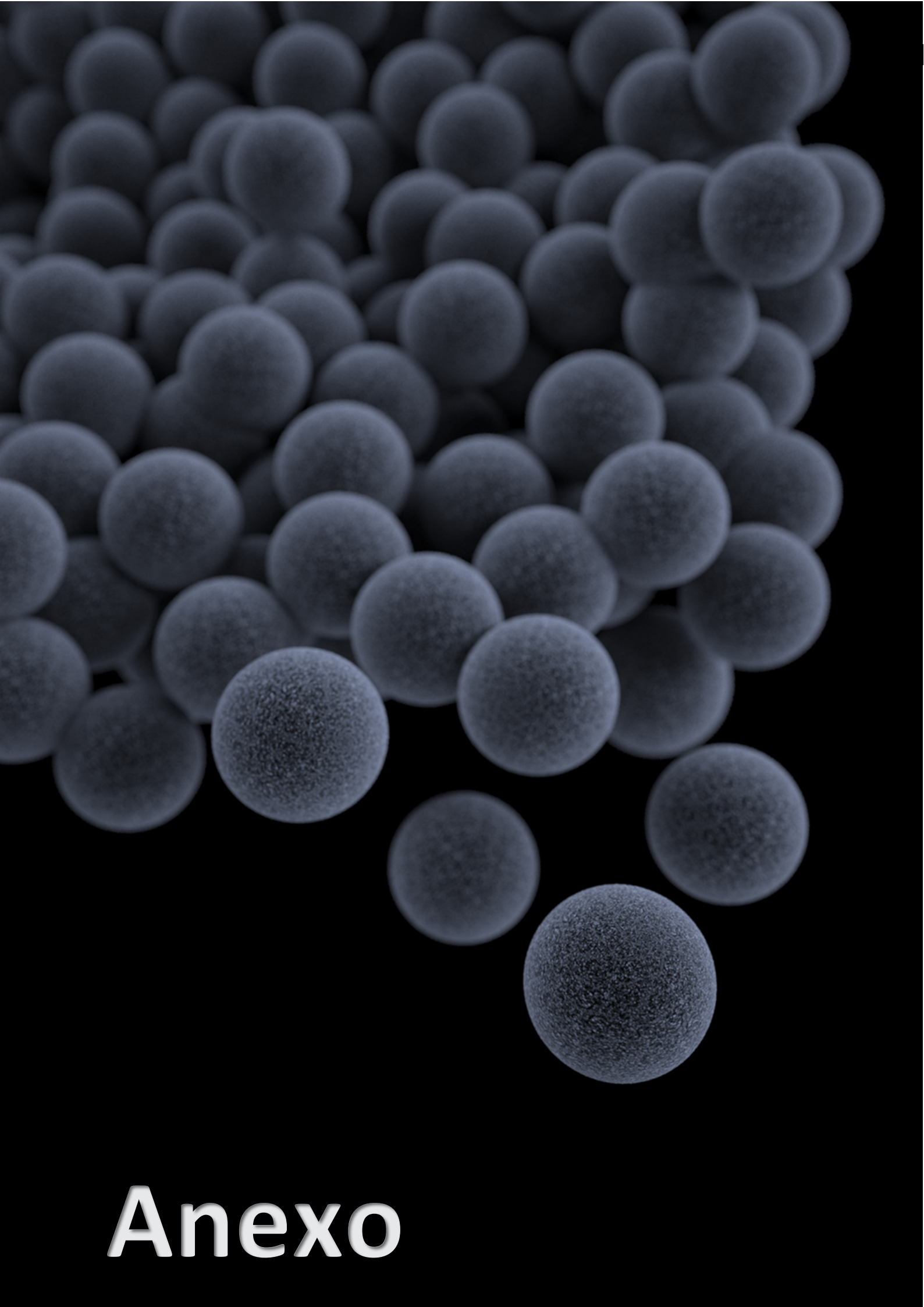
Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*

types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43:5026-5033.

Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Lössner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS*256*. Mol Microbiol 1999; 32:345-356.

Zou D, Xie K, Wang H, Chen Y, Xie M. [Inhibitory effects of biochanin A on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)]. Wei Sheng Wu Xue Bao 2014; 54(10):1204-11.

*Portada de la tesis tomada de imágenes en HD del CDC.



Anexo

Antimicrobial Original Research Paper

Genetic lineages and antimicrobial resistance genotypes in *Staphylococcus aureus* from children with atopic dermatitis: detection of clonal complexes CC1, CC97 and CC398

Daniel Benito[1], Carmen Aspiroz[2], Yolanda Gilaberte[3,4], Rosalía Sanmartín[3,4], Ángela Hernández-Martin[5], Mercedes Alonso[6], Paula Gómez[1], Carmen Lozano[1], Carmen Torres[1]

[1]Area of Biochemistry and Molecular Biology, University of La Rioja, Logroño, Spain, [2]Department of Microbiology, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain, [3]Department of Dermatology, Hospital San Jorge, Huesca, Spain, [4]Aragon Health Sciences Institute, Zaragoza, Spain, [5]Department of Dermatology, Hospital Infantil Universitario del Niño Jesús, Madrid, Spain, [6]Department of Microbiology, Hospital Infantil del Niño Jesús, Madrid, Spain

The objective was to analyse the genetic lineages of *Staphylococcus aureus* recovered from nasal and skin samples of atopic dermatitis (AD) paediatric patients, and to characterize the antimicrobial resistance phenotype–genotype and the immune-evasion-cluster (IEC) type of isolates. Forty *S. aureus* isolates from 35 patients (skin: 26; nasal samples: 14) were characterized. Isolates were submitted to *spa*-, *agr*- and multilocus sequence typing. All *S. aureus* strains analyzed were methicillin-susceptible (MSSA). High genetic diversity was detected among the 40 MSSA isolates (especially among skin isolates), with detection of 27 different *spa*-types, 20 sequence-types and 16 clonal complexes (CCs). Lineages CC30 and CC5 were predominant among nasal isolates (71% vs 23% skin). Thirteen different CCs were detected among skin isolates, with detection of clades CC1, CC9 and CC398. Antimicrobial resistance rates detected were higher in skin than in nasal isolates, especially for macrolides, aminoglycosides, lincosamides and mupirocin. Methicillin-susceptible *S. aureus* strains were characterized into five IEC-types, being A, B and F the predominant ones. Methicillin-susceptible *S. aureus* strains of lineages CC45 and CC5 were detected in almost all cases in AD patients with severe Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) and lineages CC8, and CC30 in those with mild or moderate one. As conclusion, high-clonal-diversity was detected among MSSA from AD patients, especially in skin-isolates. Colonization with *S. aureus* of some CCs seems more associated with AD severity than other lineages.

Keywords: *S. aureus*, Paediatric patients, Atopic dermatitis, CC398, CC1, CC97

Abbreviations

AD	atopic dermatitis
IEC	immune evasion cluster
MSSA	methicillin-susceptible *S. aureus*
MRSA	methicillin-resistant *S. aureus*
CC	clonal complex
CA-MRSA	community-associated *S. aureus*
HA-MRSA	hospital-associated *S. aureus*
LA-MRSA	livestock-associated *S. aureus*

Correspondence to: Carmen Torres, Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, Logroño 26006, Spain. Email: carmen.torres@unirioja.es

Introduction

Staphylococcus aureus is often found as part of the normal microbiota of humans, mainly colonising the nasopharynx and skin or soft tissues.[1] Likewise, this microorganism acts as opportunistic pathogen able to cross the first body defences causing infections or diseases of varying severity.[2,3] Atopic dermatitis (AD) is a chronic, pruritic inflammatory skin disease that follows a relapsing course. It is estimated that AD affects from 5 to 30% of children and between 2 and 10% of adults.[4,5]

In previous studies, it has been found that AD patients were frequently colonized with *S. aureus*, showing a different skin microbiota compared with healthy individuals, which showed lower rates of *S. aureus* colonization.[6–8] Although pathogenic mechanisms remain

© 2015 Edizioni Scientifiche per l'Informazione su Farmaci e Terapia
DOI 10.1179/1973947815Y.0000000044

unknown, some authors have hypothesized about the ability of *S. aureus* to exacerbate the symptoms of AD.[6,9] Previous studies have demonstrated a correlation between the severity of AD with *S. aureus* colonization[10] and its involvement in the worsening of skin lesions.[7] Furthermore, other studies suggest that early colonization by *S. aureus* in infants may be associated with higher probability of AD development in their childhood.[9]

It has been reported that methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strains were predominant among those isolated in AD-related processes, but when methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains were detected, frequently it matches with different MRSA profiles as community-associated (CA-MRSA) or hospital-associated (HA-MRSA).[5,11,12]

Regarding the global evolution of *S. aureus*, in the last years, other genetic lineages known as livestock-associated MRSA (LA-MRSA) have grown in importance globally, as is the case of lineage CC398.[13] Livestock-associated MRSA has been increasingly detected in animals and in humans, either as colonizer or causing infections. So, these genetic lineages usually cause skin and soft tissue infections (SSTIs) although other severe pathologies have been also described.[14,15]

In recent years, there is special interest to know the genetic lineages of *S. aureus* that are circulating in different environments in order to track its evolution in the different niches. For this purpose, several molecular characterization techniques are used, such as single-locus DNA sequencing of the hyper variable region of *S. aureus* protein A (*spa*), detection of *agr* allotypes accessory gene regulatory loci and the multilocus sequence typing (MLST).[16] Another important tool for discriminating invasive capacity and possible human or animal origin of isolates is the determination of the human-associated immune evasion cluster (IEC). It is constituted by a set of genes that allow to *S. aureus* to acquire invasive skills to enter and colonize the human body and ability to evade innate defences of our body.[2,16,17] Furthermore, some of the toxins included in IEC can be considered as a potential exacerbating agent for AD.[18,19]

In a previous study carried out by our group, samples of skin lesions ($n = 113$) and nasal swabs ($n = 85$) were obtained from 114 AD paediatric patients and *S. aureus* was recovered from nasal and/or skin lesions of 45 of these patients (skin prevalence 23.5%; nasal prevalence 28.3%). Skin colonization varied according to the AD severity (7.1, 19.5 and 71.4% in mild, moderate or severe processes, respectively).[10] The presence of virulence genes was studied in a collection of 40 *S. aureus* isolates recovered from 35 of tested patients in that study (nine additional *S. aureus* isolates recovered in the study were lost, one of them was MRSA). The aim of the present work was to determine the resistance phenotype of this collection of isolates and also to determine their clonal lineages and their content in antimicrobial resistance genes as well as in genes of the IEC system.

Material and Methods

Staphylococcus aureus included in the study

The collection of 40 *S. aureus* isolates recovered in the previous study from paediatric patients with AD[10] were included in the present work. The strains corresponded to samples of skin lesions ($n = 26$) and of nasal swabs ($n = 14$) and they were obtained from 35 patients in which the severity of AD process [measured by the Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD) score] was established in the previous study;[10] in this sense, patients were classified as severe (≥ 40, 13 patients), moderate (15–39, 20 patients) or mild (< 15, two patients).

Susceptibility testing and characterization of resistance genes

The resistance phenotype to 17 antimicrobials (penicillin, oxacillin, cefoxitin, tetracycline, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, streptomycin, kanamycin, vancomycin, linezolid, mupirocin, fusidic acid, chloramphenicol and trimethoprim-sulphamethoxazole) was determined by both Vitek2 system (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) and the disk-diffusion method.[20,21] In addition, the presence of 19 antimicrobial resistance genes [including *blaZ, mec(A), mec(C), erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(T)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *mph(C)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *ant(4′)-Ia*, *aph(3′)-IIIa*, *aac(6′)-aph(2″)*, *fus(B)*, *fus(C)* and *mup(A)*] was analyzed by PCR.[16,22] Positive and negative controls for each PCR were used.

Molecular typing of isolates

All isolates were typed by *spa* (www.ridom.com), *agr*[16] and MLST (www.saureus.mlst.net), and according to the sequence type (ST) detected, isolates were ascribed to a specific clonal complex (CC) (www.saureus.mlst.net/eburst). Only one isolate of each *spa*-type was MLST-typed.

Detection of IEC genes

The five genes of the IEC cluster (*scn, chp, sak, sea* and *sep*) were studied by PCR.[17] Positive and negative controls for each PCR were used.

Results

Tables 1 and 2 show the characteristics of the 40 *S. aureus* isolates recovered from skin and nasal samples, respectively, of AD paediatric patients characterized in this study. All of them were MSSA.

Table 1 Characteristics of 26 *Staphylococcus aureus* isolated from skin samples of patients with AD included in this study.

N° isolates	Patient	Molecular typing			Antimicrobial resistance		Virulence factors IEC type[a, d]	SCORAD[e]
		spa-type[a]	*agr*	MLST/CC[b]	Phenotype[a,c]	Genotype[a]		
2	1, 2	t012	III	ST30/CC30	PEN, MUP	*blaZ*	A[1], B[1]	M
1	3	t021	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	M
1	4	t002	II	ST5/CC5	PEN, ERY	*blaZ, msr(A), msr(B), mphC*	F	S
1	5	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msr(A), mph(C)*	F	S
1	6	t777	II	ST5/CC5	ERY, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6′)-Ie-aph(2″), ant(4′)-Ia*	F	S
3	7, 8, 9	t085[1]/t1509[1], t1877[1]	II	ST15/CC15	PEN[2]	*blaZ*[2]	B[1], C[2]	Mi[1], M[1], S[1]
1	10	t10665	II	ST582/CC15	–	–	A	S
2	11, 12	t015[1], t3972[1]	I	ST45/CC45	PEN, GEN, KAN, TOB, MUP	*blaZ, aac(6′)-Ie-aph(2″)*[1], *ant(4′)-Ia*[1], *mup(A)*[1]	F	S
1	13	t728	I	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	F	S
3	14, 15, 16	t008	I	ST8/CC8	PEN[1], GEN[2], KAN[2], TOB[1], MUP[1]	*blaZ*[2], *aac(6′)-Ie-aph(2″)*[2], *ant(4′)-Ia*[1], *mup(A)*[1]	B[1], F[2]	M
1	17	t088	I	ST80/CC80	PEN	*blaZ*	B	M
1	18	t571	I	ST398/CC398	PEN, ERY, CLI	*blaZ, erm(T)*	C	S
1	19	t127	III	ST1/CC1	PEN, ERY, CLI	*blaZ, erm(A)*	A	M
2	20, 21	t209	II	ST109/CC9	PEN, ERY, CLI[1], FUS[1]	*blaZ, msr(A)*[1],*mphC, erm(A)*[1]	F	M[1], S[1]
1	22	t304	I	ST6/CC6	PEN	– A	S	
2	23, 24	t091[1], t803[1]	I	ST7/CC7	PEN	*blaZ*	F	M[1], S[1]
1	25	t240	I	ST10/CC10	PEN	*blaZ*	B	S
1	26	t2933	I	ST22/CC22	PEN	*blaZ*	F	M

[a] Superscript marks the number of isolates in those cases in which not all isolates of the group have the indicated characteristic.
[b] At least one isolate of each *spa*-type was submitted to MLST-typing and the sequence types (STs) and clonal complexes (CCs) were assigned for all strains of the same *spa*-type.
[c] Antimicrobials – ERY: erythromycin; CLI: clindamycin; GEN: gentamicin; TOB: tobramycin; MUP: mupirocin; FUS: fusidic acid.
[d] IEC: Immune Evasion Cluster; IEC type A (*scn, chp, sak, sea*); IEC type B (*scn, chp, sak*); IEC type C (*scn, chp*); IEC type E (*scn, sak*); IEC type F (*scn, chp, sak, sep*).
[e] SCORAD: S, severe (≥40); M, moderate (between 15 and 39); Mi, mild (<15).

Table 2 Characteristics of the 14 *Staphylococcus aureus* isolated from nasal samples of patients with AD included in this study.

N° isolates	Patient	Molecular typing			Antimicrobial resistance		Virulence factors IEC type[a,d]	SCORAD[e]
		spa-type[a]	*agr*	MLST/CC[b]	Phenotype[a,c]	Genotype[a]		
3	1, 2, 27	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A[1], B[2]	M
1	3	t021	III	ST30/CC30	PEN, FUS	*blaZ*	A	Mi
1	28	t021	III	ST1869/CC30	PEN	*blaZ*	A	M
1	29	t1057	III	ST1842/CC30	PEN	*blaZ*	F	M
1	30	t136	III	ST34/CC30	PEN	–	E	M
1	31	t002	II	ST5/CC5	PEN	*blaZ*	F	M
1	5	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msr(A), mph(C)*	F	S
1	6	t777	II	ST5/CC5	ERY, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6′)-Ie-aph(2″), ant(4′)-Ia*	F	S
1	32	t008	I	ST8/CC8	PEN	–	B	M
1	33	t267	I	ST97/CC97	PEN	*blaZ*	B	M
1	34	t1307	I	ST1952/CC59	PEN	*blaZ*	F	M
1	35	t5739	I	ST182/CC182	PEN	*blaZ*	B	M

[a] Superscript marks the number of isolates in those cases in which not all isolates of the group have the indicated characteristic.
[b] At least one isolate of each *spa*-type was submitted to MLST-typing and the sequence types (STs) and clonal complexes (CCs) were assigned for all strains of the same *spa*-type.
[c] Antimicrobials – PEN: penicillin; ERY: erythromycin; GEN: gentamicin; KAN: kanamycin; TOB: tobramycin; FUS: fusidic acid.
[d] IEC: Immune Evasion Cluster; IEC type A (*scn, chp, sak, sea*); IEC type B (*scn, chp, sak*); IEC type E (*scn, sak*); IEC type F (*scn, chp, sak, sep*).
[e] SCORAD: S, severe (≥40); M, moderate (between 15 and 39); Mi, mild (<15).

Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes among isolates from skin samples

Antimicrobial susceptibility testing showed the following results in the 26 MSSA skin isolates studied (% of resistant isolates/genes detected): penicillin (76.9%/*blaZ*), erythromycin [23.1%/*msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *erm*(A), *erm*(T)], clindamycin (11.5%), kanamycin and gentamicin [19.2%/*aac*(6′)-*Ie*-*aph*(2″)], tobramycin [15.4%/*ant*(4′)-*Ia*], mupirocin [19.2%/*mup*(A)] and fusidic acid (3.8%/no genes detected).

Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes among isolates from nasal samples

Antimicrobial susceptibility testing showed the following results in the 14 *S. aureus* nasal isolates studied (% of resistant isolates/genes detected): penicillin (85.7%/*blaZ*), erythromycin [14.3%/*msr*(A), *msr*(B), *mph*(C)], kanamycin [7.1%] and gentamicin [7.1%/*aac*(6′)-*Ie*-*aph*(2″)]; tobramycin [7.1%/*ant*(4′)-*Ia*], and fusidic acid [7.1%/no genes detected].

Molecular typing of S. aureus isolates from skin samples of AD paediatric patients

A high clonal diversity was evidenced among the studied MSSA skin isolates (Table 1), with the identification of 22 different *spa*-types. One isolate presented a new *spa*-type that was named as t10665. Moreover, 14 different sequence types (STs) belonging to 13 different clonal complexes (CCs) were identified in our 26 MSSA strains from skin samples, being predominant ST/CC as follows (% of isolates): ST15 or ST582/CC15 (15.4%), ST30/CC30 (11.5%), ST5/CC5 (11.5%), ST45/CC45 (11.5%); ST8/CC8 (11.5%), the remaining 38.6% of these isolates included many CCs, most notably: CC1, CC9, CC80 and CC398. The most frequent *agr* allotype detected was *agr*-I (13 isolates) followed by *agr*-II (nine isolates), and *agr*-III (four isolates).

Molecular typing of S. aureus isolates from nasal samples of AD paediatric patients

Eleven different *spa*-types were detected associated with nine STs, belonging to six different CCs. Interestingly, 50% of strains from nasal origin belonged to CC30 clone. The remaining 50% of these isolates included other CC as follows [CC (number of isolates)]: CC5(3), CC8(1), CC97(1), CC59(1) and CC182(1). The most frequent *agr* allotype detected was *agr*-III (seven isolates) followed by *agr*-I (four isolates) and *agr*-II (three isolates).

All *S. aureus* isolates harbored the genes of the IEC system. The following IEC types were obtained [IEC type (% of isolates)]: IEC A (22.5%), IEC B (20%), IEC C (7.5%), IEC E (2.5%) and IEC F (47.5%). The isolate ST398 presented the IEC type C.

Table 3 Characteristics of the *Staphylococcus aureus* isolated from the AD paediatric patients in which *S. aureus* were recovered from both nasal and skin samples.

Patient	Origin strain	Molecular typing			Phenotype[a,c]	Antimicrobial resistance Genotype[a]	Virulence factors IEC type[a,d]	SCORAD[e]
		spa-type[a]	*agr*	MLST/CC[b]				
1	Nasal	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	M
	Skin	t012	III	ST30/CC30	PEN, MUP	*blaZ*	A	M
2	Nasal	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	B	M
	Skin	t012	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	B	M
3	Nasal	t021	III	ST30/CC30	PEN, FUS	*blaZ*	A	M
	Skin	t021	III	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	M
5	Nasal	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msrA, mphC*	F	S
	Skin	t071	II	ST5/CC5	ERY	*msrA, mphC*	F	S
6	Nasal	t777	II	ST5/CC5	ERY, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6′)-Ie-aph(2″), ant(4′)-Ia*	F	S
	Skin	t777	II	ST5/CC5	ERY, GEN, KAN, TOB	*msr(A), msr(B), mph(C), aac(6′)-Ie-aph(2″), ant(4′)-Ia*	F	S

[a] Superscript marks the number of isolates in those cases in which not all isolates of the group have the indicated characteristic.
[b] At least one isolate of each *spa*-type was submitted to MLST-typing and the STs and CCs were assigned for all strains of the same *spa*-type.
[c] Antimicrobials – PEN: penicillin; ERY: erythromycin; GEN: gentamicin; KAN: kanamycin; TOB: tobramycin; FUS: fusidic acid: MUP: mupirocin.
[d] IEC: Immune Evasion Cluster. IEC type A (*scn, chp, sak, sea*); IEC type B (*scn, chp, sak*); IEC type F (*scn, chp, sak, sep*).
[e] SCORAD: S, severe (≥ 40); M, moderate (between 15 and 39); Mi, mild (< 15).

Relationship among clonal lineages and severity of AD processes

In the five patients in whom *S. aureus* was recovered from both nasal and skin samples, they harboured isolates with similar genetic lineages in both anatomic locations: three patients harboured *S. aureus* ST30/CC30 and presented a moderate SCORAD and two patients harboured *S. aureus* ST5/CC5 with severe SCORAD (Table 3).

Moreover, all eight out of nine nasal and skin isolates of lineages ST5/CC5 and ST45/CC45 recovered in this study corresponded to six patients which presented severe SCORAD. The unique isolate CC398 obtained in this study from a skin sample corresponded also to a severe patient. On the contrary, all 12 *S. aureus* isolates recovered from nasal and skin samples of lineages CC30 and CC8 were recovered from patients with moderate SCORAD (but one case with mild) (Tables 1 and 2).

Discussion

Differences between strains of nasal origin and skin origin of AD paediatric patients have been found, particularly among genetic lineages detected and resistance phenotypes found, showing in general greater diversity and higher antibiotic-resistance rates for some antimicrobial agents than those of skin origin.

The high genetic diversity of *spa* types (27 different *spa* types, one of them new), sequences types (20 different STs) and CCs (16 different CCs) detected among all MSSA strains studied is outstanding (both from skin or nasal origin). The detection of identical MSSA clones in the nasal and skin samples in all five patients in which *S. aureus* was recovered from both anatomical sites suggests the importance of the nasal colonization as a source of staphylococci for skin colonization or infection, as has been previously reported by others.[5,11,18]

According with the results obtained, it seems that some specific lineages of *S. aureus* are more frequently detected in AD paediatric patients with severe process (SCORAD $\geq$40), as is the case of isolates CC5 and CC45, typical hospital-associated lineages detected in other studies.[11,23] It is also relevant to the detection of MSSA-CC398-t571 in the skin sample of one severe case. Previous studies have referred the detection of MSSA-t571 as nasal or even faecal colonizer of healthy humans,[1,16] although human infections due to this lineage have also been reported.[24,25] CC30 and CC8, associated with community infections caused by MRSA isolates,[26] were found among our MSSA isolates. These clonal lineages were not detected in our AD patients with high severity but in those of moderate or mild disease. More studies and a higher number of isolates would be necessary to know the relationship of these clonal lineages with the severity of the skin lesions.

Detection of genetic lineages named CA-MRSA seems to be more associated with SSTIs in AD patients. Although all of our typed strains were MSSA, we must not despise them. In last years, some authors have hypothesized about the possibility of evolution of CA-MRSA from MSSA strains that circulated in the community and subsequently acquired the SCC*mec*. For this, it is important to track the evolution of circulating MSSA strains, considering that many of them have similar clinical characteristics to CA-MRSA or HA-MRSA ones.[12]

The detection of CC30 clade in more than 50% of nasal isolates and in 11.5% of the skin ones is remarkable. This genetic lineage is frequently found as colonizer of human microbiota,[16,27] but also as causal agent of infections, mainly community associated (CA).[3,28,29] Interestingly, in the previous study of our group,[10] 90% of these CC30 strains harboured the gene encoding the toxic shock syndrome toxin (TSST), being this percentage higher than the one found in other studies with these strains.[1] This virulent profile matches with the low content in-resistance determinants presented in this type of CA strains, as other authors have previously indicated.[30] Similar typical characteristics of CA-MSSA (virulent strains and few resistance determinants) have been also found in our CC15 strains.

Four strains of lineage ST8/CC8 and one of lineage ST80/CC80 were found, mainly among skin samples. These clades were common among CA-MRSA namely USA300 and 'European CA-MRSA', respectively.[26,31] In addition, these genetic lineages often carry a wide variety of antimicrobial resistance determinants for macrolides and aminoglycosides as *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *aac*(6′)-*Ie*-*aph*(2″), *ant*(4′)-*Ia* and *aph(3′)-IIIa.* In our case, CC8 strains lacked methicillin- and macrolide-resistance genes and PVL-toxin genes but presented a multidrug resistance phenotype.

No less important was the detection of CC1, CC9 and CC97 as well as one CC398 strain, mainly in skin samples. Isolates belonging to these clonal lineages have been associated with livestock animals and they usually present methicillin and tetracycline resistance.[13] However, all our strains showed susceptibility to these antimicrobials. Interestingly, two strains typed as t209/ST109/CC9 were detected among our strains. Methicillin-resistant *S. aureus* strains belonging to this genetic lineage have been also found in animals, specifically in pigs in Asia.[32] The presence of genes that comprise the IEC system in these strains suggested their human origin.[16,33]

In the same line, the strain typed as t571/ST398/CC398 also harboured the genes of the human-associated IEC type-C, fact that points to a human origin.[16] It is remarkable that t571/CC398 clade seems to be easily transmittable between humans.[34] Other authors have postulated that the CC398 lineage could be originated in humans as MSSA and then spread to livestock, where it subsequently acquired the *mecA* gene and became well adapted to these animals. Furthermore, this MSSA-CC398 strain harboured the *erm*(T) gene, proposed as a human marker.[24] Remarkably, strain typed as MSSA-t127/ST1/CC1, harboured IEC type-A which contains staphylokinase toxin – sak gene-. Some authors have hypothesized that the presence of this gene (sak) can be considered as a marker of the human clade in contrast with MRSA-CC1 most nearly to the animal origin.[35]

All of the strains of the study presented genes of the IEC system, being mostly IEC type F, more associated with clinical or hospital acquired clones (CC5, CC22, CC45), and IEC type A or B, related to community clonal lineages (CC8, CC15, CC30, CC80). In previous studies, it has been suggested that IEC system may be lineage specific in some cases.[33] However, these sets of genes, especially staphylococcal complement inhibitor (*scn* gene), increase the skills of *S. aureus* to evade and outflank the first stages of human innate defences, interfering with activation of the complement cascade. Furthermore, some authors suggested that the presence and expression of *scn* gene could be correlated with AD severity.[18] Recent studies have associated the PTSAs (pyrogenic toxin superantigen) with the invasive capability of *S. aureus* in patients with skin lesions and with the exacerbation of atopic dermatitis,[19] especially highlighting SEA enterotoxin (-*sea* gene- included in the IEC type A), and SEB and SEC enterotoxins (-*seb*, *sec* gene-, respectively). In a previous study performed by our group, virulence profiles of all isolates were determined, being all of them negative for these enterotoxins, except for two strains typed as t015/ST45/CC45 and t728/ST45/CC45 isolated from skin (harbouring *sec* gene) and one strain typed as t1307/ST1952/CC59 isolated from a nasal swab (harbouring *seb* gene).[10] Previous studies have suggested an association between some genetic lineages and the production of enterotoxins, as is the case of CC45 which was identified as a source of SEC producing strains.[5]

The very low prevalence of methicillin resistance among *S. aureus* isolates that colonize the skin or nares of paediatric AD patients in our study, agrees with previous studies carried out in our area[18] and in other countries throughout the world such as Canada, England, China or Portugal.[5,11,12,31] This fact is in accordance with previous reports that suggested that AD patients do not seem especially susceptible to infection or colonization by MRSA.[36,37] Even though, some AD patients could have higher susceptibility to colonization by *S. aureus*, due to loss of integrity of skin barriers and the decrease in response of the innate immune system.[11]

Regarding the resistance profiles of the forty MSSA strains characterized in this study, higher rates of resistance were shown among those from skin than nasal origin, except for penicillin or fusidic acid. Differences were evident on resistance rates to macrolides, aminoglycosides and lincosamides. Anyway, these results show intermediate values compared with previous studies in the case of resistances to erythromycin (from 15 to 50%) or gentamicin (5– 25%).[12,38,39] These rates could be explained by the wide use of macrolides as a first-line agent in paediatric patients allergic to penicillin, or in the case of gentamicin by its common topical use in association with corticosteroids in dermatitis.[40] It is remarkable the moderate to high rates of resistance to mupirocin (19.2%) and fusidic acid (3.8%) detected among our skin strains compared with other studies (from 0 to 5%).[39] The high rates of mupirocin resistance detected may be due to the use of mupirocin as treatment for the topical therapy of cutaneous lesions of *S. aureus.* In fact, in patients with moderate to severe AD and clinical signs of secondary bacterial infections, bleach baths and intranasal may be recommended to reduce disease severity.[41] Respect to fusidic acid, its wide use as anti-staphylococcal drug is very well known and is one of the first-line antimicrobials to treat impetigo.[38,40]

Conclusion

In conclusion, a high diversity of genetic lineages of *S. aureus* was detected among the isolates of atopic children in the present study, emphasising the detection of clades traditionally associated with farm animals (CC1, CC9, CC97, CC398) but showing some molecular characteristics related to human clades (all strains harboured IEC genes). It seems that some genetics lineages of *S. aureus* (as CC5 or C45) are associated with higher AD severity than others (CC30 or CC8); nevertheless, studies with more AD patients should be performed in the future to demonstrate if this tendency is confirmed.

Disclaimer Statements

Contributors D. Benito, P. Gómez and C. Lozano: molecular characterization of isolates, analysis of results and writing and revision of manuscript. C. Aspiroz and M. Alonso: identification and antimicrobial susceptibility testing of isolates, analyses of results, and revision of the manuscript. Y. Gilaberte, R. Sanmartín, and A. Hernández-Martin: detection of clinical cases, clinical data analysis, analysis of results and final revision of manuscript. C. Torres:

general design of study, analysis of results, writting and revision of manuscript.

Funding This work was supported by Project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Daniel Benito has a predoctoral fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and Paula Gómez has a predoctoral fellowship of the Universidad de La Rioja (Spain). Carmen Lozano has a contract associated with Project SAF2012-35474.

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval Ethical approval was not required.

References

1 Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. Int J Med Microbiol. 2011;301:500–5.
2 Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. Vet Dermatol. 2009;20(5–6):456–70.
3 Van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, *et al.* Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2009;9:32–47.
4 Bieber T. Atopic dermatitis. N Engl J Med. 2008;358(14):1483–94.
5 Yeung M, Balma-Mena A, Shear N, Simor A, Pope E, Walsh S, *et al.* Identification of major clonal complexes and toxin producing strains among *Staphylococcus aureus* associated with atopic dermatitis. Microbes Infect. 2011;13(2):189–97.
6 Gomes PL, Malavige GN, Fernando N, Mahendra MH, Kamaladasa SD, Seneviratne JK, *et al.* Characteristics of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic dermatitis in Sri Lanka. Clin Exp Dermatol. 2011;36(2):195–200.
7 Gong JQ, Lin L, Lin T, Hao F, Zeng FQ, Bi ZG, *et al.* Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial. Br J Dermatol. 2006;155(4):680–7.
8 Guzik TJ, Bzowska M, Kasprowicz A, Czerniawska-Mysik G, Wójcik K, Szmyd D, *et al.* Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. Clin Exp Allergy. 2005;35(4):448–55.
9 Lebon A, Labout JA, Verbrugh HA, Jaddoe VW, Hofman A, van Wamel WJ, *et al.* Role of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in atopic dermatitis in infants: the generation R study. Arch Pediatr Adolesc Med. 2009;163(8):745–9.
10 Gilaberte Y, Sanmartín R, Aspiroz C, Hernandez-Martin A, Benito D, Sanz-Puertolas P, *et al.* Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing children with atopic dermatitis. Pediatr Dermatol. 2014. doi: 10.1111/pde.12436.
11 Balma-Mena A, Lara-Corrales I, Zeller J, Richardson S, McGavin MJ, Weinstein M, *et al.* Colonization with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis: a cross-sectional study. Int J Dermatol. 2011;50(6):682–8.
12 Wu D, Wang Q, Yang Y, Geng W, Wang Q, Yu S, *et al.* Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(1):1–8.
13 Benito D, Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Vasquez MA, Ceballos S, *et al.* Characterization of tetracycline and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital: is livestock-contact a risk factor in infections caused by MRSA CC398? Int J Med Microbiol. 2014;304:1226–32.
14 Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu*(A) gene. Clin Microbiol Infect. 2011;17:923–7.
15 Rasigade JP, Laurent F, Hubert P, Vandenesch F, Etienne J. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. Emerg Infect Dis. 2010;16:1330.
16 Benito D, Lozano C, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. Microb Ecol. 2013;66:105–11.
17 Van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. J Bacteriol. 2006;188:1310–5.
18 Rojo A, Aguinaga A, Monecke S, Yuste JR, Gastaminza G, España A. *Staphylococcus aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: may factors other than superantigens be involved? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33:651–8.
19 Lee HW, Kim SM, Kim JM, Oh BM, Kim JY, Jung HJ, *et al.* Potential immunoinflammatory role of staphylococcal enterotoxin A in atopic dermatitis: immunohistopathological analysis and in vitro assay. Ann Dermatol. 2013;25(2):173–80.
20 Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty two informational supplement*. Wayne, PA, USA: CLSI; 2014[M100-S24].
21 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 4.0, 2014Available from: http://www.eucast.org.
22 Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mec*A homologue in humans in Germany. PLoS One. 2011;6(9):e24360.
23 Chua KY, Howden BP, Jiang JH, Stinear T, Peleg AY. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014;21:554–62.
24 Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, *et al. Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio. 2012;3:e305–11.
25 Vandendriessche S, Kadlec K, Schwarz S, Denis O. Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm*(T) in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother. 2011;66:2455–9.
26 Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, Deleo FR. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014;21:563–74.
27 Argudín MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR. Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. Microb Pathog. 2013;54:26–33.
28 Deurenberg RH, Stobberingh EE. The molecular evolution of hospital and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Mol Med. 2009;9:100–15.
29 González-Domínguez M, Benito D, Sevil-Puras M, Aspiroz-Sancho C. Familial furunculosis associated with a multidrug resistance community clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) producer Panton Valentine leukocidin (PVL). Enferm Infec Microbiol Clin. 2015. doi: 10.1016/j.eimc.2014.12.008.
30 Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7:629–41.
31 Conceição T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, *et al.* High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30(2):293–7.
32 Cui S, Li J, Hu C, Jin S, Li F, Guo Y, *et al.* Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. J Antimicrob Chemother. 2009;64:680–3.

33 McCarthy AJ, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study. Infect Genet Evol. 2013;19:7–14.
34 David MZ, Siegel J, Lowy FD, Zychowski D, Taylor A, Lee CJ, *et al.* Asymptomatic carriage of sequence type 398, *spa* type t571 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an urban jail: a newly emerging, transmissible pathogenic strain. J Clin Microbiol. 2013;51:2443–7.
35 Franco A, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Stegger M, Pantosti A, *et al.* Molecular characterization of *spa* type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. J Antimicrob Chemother. 2011;66:1231–5.
36 Huang JT, Abrams M, Tlougan B, Rademaker A, Paller AS. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. Pediatrics. 2009;123:e808–14.
37 Matiz C, Tom WL, Eichenfield LF, Pong A, Friedlander SF. Children with atopic dermatitis appears less likely to be infected with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the San Diego experience. Pediatr Dermatol. 2011;28:6–11.
38 Hill SE, Yung A, Rademaker M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance in children with atopic dermatitis: a New Zealand experience. Australas J Dermatol. 2011;52(1):27–31.
39 Tang CS, Wang CC, Huang CF, Chen SJ, Tseng MH, Lo WT. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in children with atopic dermatitis. Pediatr Int. 2011;53(3):363–7.
40 Petry V, Bessa GR, Poziomczyck CS, Oliveira CF, Weber MB, Bonamigo RR, *et al.* Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. An Bras Dermatol. 2012;87(5):729–34.
41 Eichenfield LF, Wynnis LT, Timothy GB, Alfons K, Paller AS, Schwarzenberger K, *et al.* Guidelines of care for management of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2014;71:116–32.

International Journal of Medical Microbiology 304 (2014) 1226–1232

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijmm

Characterization of tetracycline and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital: Is livestock-contact a risk factor in infections caused by MRSA CC398?

Daniel Benito[a,1], Carmen Lozano[a,1], Antonio Rezusta[b,c], Isabel Ferrer[b], Maria Alejandra Vasquez[b], Sara Ceballos[a], Myriam Zarazaga[a], Maria José Revillo[b], Carmen Torres[a,*]

[a] *Area de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain*
[b] *Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragón, Zaragoza, Spain*
[c] *Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 May 2014
Received in revised form 30 August 2014
Accepted 21 September 2014

Keywords:
Animal contact
Livestock associated MRSA
CC398
CC1
Multi-resistance
Tetracycline

ABSTRACT

Tetracycline-resistance (Tet^R) has been postulated as a marker of the livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) lineage CC398. Objectives of the study: to determine the *spa*-types and assigned MLST clonal complexes (CCs) among all 98 MRSA-Tet^R strains recovered during 2011–2012 (from different patients) in a Spanish Hospital, analyzing the possible correlation with livestock-contact of the patients. All 98 strains were assigned to 9 CCs: CC398 (60.2%), CC1 (19.4%), CC5 (12.2%), and other CCs (8.2%). The 98 patients were classified into three groups: (A) contact with livestock-animals ($n = 25$); (B) no-contact with livestock-animals ($n = 42$); (C) no information about animal contact ($n = 31$). A significant higher percentage of CC398 strains was obtained in group A (76%) than in group B (50%) ($p < 0.05$), being the percentage in group C of 61.3%. Most of MRSA-Tet^R-CC398 strains presented a multi-resistance phenotype, including erythromycin, clindamycin, and ciprofloxacin, and the most prevalent detected genes were *tet*(M) and *erm*(C). Three strains presented the phenotype macrolide-susceptibility/lincosamide-resistance and contained the *vga*(A) gene. MRSA-CC1 strains showed higher percentages of erythromycin/clindamycin resistance (95%/89%) than MRSA-CC398 strains (58%/63%), and this resistance was usually mediated by *erm*(C) gene. Most of MRSA-CC5 strains showed resistance to ciprofloxacin, tobramycin/kanamycin and erythromycin. None of the strains presented the genes *lukF/lukS*-PV, *tsst*-1, *eta*, *etb* or *etd*. All MRSA-CC398 strains lacked the genes of the immune-evasion-cluster, but MRSA-CC1 strains carried these genes (type E). In conclusion, although MRSA CC398 is detected in a significant higher proportion in patients with livestock-contact; its detection in people without this type of contact also indicates its capacity for human-to-human transmission.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Staphylococcus aureus is part of the natural microbiota of the nose, skin, and even the intestinal tract of humans (Benito et al., 2013). Although *S. aureus* can coexist peacefully as a commensal, it is also a bacterium responsible for a wide variety of infections and diseases (Lozano et al., 2011). *S. aureus* is able to develop resistance to multiple antimicrobials, methicillin resistance being of major importance. So, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) is resistant to almost all beta lactams and is associated with both hospital and community infections.

There are some clonal lineages, which have been associated with livestock-animals and these strains are now called livestock-associated (LA) MRSA. The first description of LA-MRSA was in 2005 in pigs and pig farmers and the strains belonged to clonal complex CC398 (Armand-Lefevre et al., 2005). Since then, the number of cases caused by this genetic lineage has been increasing. Initially, the infections described were mainly single cases, all of them in patients with contact with livestock-animals (farmers, veterinarians or abattoir workers) or in their relatives (Lozano et al., 2012a). So, the professional relationship with livestock-animals was considered as a risk factor of colonization and infection by MRSA-CC398 (Garcia-Graells et al., 2012). However, this CC has

* Corresponding author. Tel.: +34 941 299750; fax: +34 941 299721.
E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.004
1438-4221/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

been progressively detected in hospital settings (Verkade et al., 2012; Williamson et al., 2014), and in the community (VanCleef et al., 2011). A previous study carried out by our research group established that tetracycline resistance (Tet^R) could be a good marker for the rapid determination of CC398 strains and other animal-related CCs among MRSA clinical isolates. In that study, it was shown that CC398 represented a high proportion among all MRSA-Tet^R (67.3%) obtained in the period 2009–2010. However, the potential link with livestock-contact was not analyzed (Lozano et al., 2012b). For that reason, in the present study we study the *spa*-types and associated clonal complexes among all MRSA-Tet^R isolates obtained during 2011–2012 from different patients in the same hospital (including isolates associated with both infection and colonization), evaluating the potential link with livestock-contact of patients.

Material and methods

Selection of the strains

During 2011–2012, MRSA isolates represented 22.5% of the total *S. aureus* isolates recovered in the studied Hospital (Universitary Hospìtal Miguel Servet, Zaragoza, Spain). In that two-year period, 749 patients carried MRSA and 98 of them (13.1%) presented resistance, in addition to methicillin, to tetracycline (MRSA-Tet^R). Among these 98 MRSA-Tet^R isolates, 40 of them were recovered from nasal or pharyngeal samples and corresponded to colonization isolates (40.8%), and the remaining 58 corresponded to significant clinical isolates (59.2%).

In the present work, a epidemiological survey was conducted in all patients with MRSA-Tet^R, (in most of the cases by telephonic interview, and in some other cases by contact to patients whilst on the ward) to determine the possible contact with livestock-animals during the previous 18 months, and three groups could be established: (A) 25 patients that referred livestock-contact; (B) 42 patients that referred no livestock-contact; and (C) 31 patients for which no information about livestock-contact was obtained.

Molecular typing of strains

MRSA-Tet^R isolates were characterized by sequenced-based typing of the hyper-variable region of the *S. aureus* protein A (*spa*) gene (Supplementary Table S1). Sequences were analyzed using the Ridom Staph-Type software version 1.5.21 (Ridom GmbH). Detection of *agr* allotypes was carried out by 2 multiplex PCRs in all strains (Supplementary Table S1). SCC*mec*-typing was carried out by multiplex PCRs, as previously described (Zhang et al., 2005). Multi-locus-sequence-typing (MLST) was performed, at least, in one strain of each *spa*-type detected (www.saureus.mlst.net). The MLST clonal complexes (CCs) of the strains were assigned according to the sequence type (ST) determined and/or *spa* type detected.

Resistance phenotypes and genotypes

Susceptibility testing for 16 antibiotics (penicillin, oxacillin, cefoxitin, tetracycline, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, kanamycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, linezolid, mupirocin, fusidic acid, vancomycin, and teicoplanin) was carried out using the Microscan system and/or the agar disk-diffusion method, and CLSI breakpoints were used (Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2013), except for fusidic acid and mupirocin (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2014).

The presence of 23 antibiotic resistance genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *erm(T)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *mph(C)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)*, *ant(4′)-Ia*, *aph(3′)-IIIa*, *aac(6′)-aph(2″)*, *fus(B)*, *fus(C)*, *mup(A)*, *dfr(S1)*, *dfr(D)*, and *dfr(K)* was analyzed by PCR and sequencing (Supplementary Table S1).

Virulence genes

The presence of the genetic determinants of the Panton-Valentine leukocidin (PVL) (*lukF/lukS*-PV), toxic shock syndrome toxin (*tsst-1*), exfoliative toxin A (*eta*), B (*etb*), and D (*etd*), as well as alpha-(*hlA*), beta-(*hlB*), delta-(*hlD*), gamma (*hlG*), and gamma-hemolysin variant (*hlGv*) was investigated by PCR. In addition, the genes encoding leukocidins DE (*luk-DE*) and M (*lukM*), aureolysin (*aur*), the biofilm associated protein *bap*, and the adhesion factor *cna* were also studied by PCR (Supplementary Table S1).

Immune evasion cluster (IEC)

The presence of genes comprised by the immune evasion cluster (IEC) (*scn*, *chp*, *sak*, *sea* and/or *sep*) was studied by PCR, and according to the pattern of genes detected, strains were classified into five different IEC types (Van Wamel et al., 2006).

Results

Ninety-eight MRSA-Tet^R isolates recovered from different patients of the hospital were characterized in the present study, which represented 13.1% of total MRSA strains isolated (749 strains). All 98 patients were surveyed to investigate if they had contact with livestock-animals in the previous 18 months of being admitted to the hospital. Twenty-five of the 98 patients carrying MRSA-Tet^R reported livestock-contact (25.5%), mainly pigs and chickens [group A, Table 1], other 42 patients referred no livestock-contact (42.9%) [group B, Table 2] and for the remaining 31 patients, no data related to livestock-contact could be obtained (31.6%) [group C, Table 3]. The number of isolates corresponding to infection/colonization samples in the three patient groups was as follows: A (12/13), B (28/14) and C (18/13).

Molecular typing of strains

Twenty-one different *spa*-types were identified among the 98 MRSA-Tet^R strains. Among these, five *spa*-types were predominant (number of strains): t011 (44), t127 (18), t1451 (7), t067 (6), and t1255 (4). The remaining 16 *spa*-types were detected only in one or two of the isolates: t1197, t2220, t5229, t002, t024, t167, t216, t688, t701, t899, t1456, t1594, t1606, t1618, t1784, and t10664 (this last one firstly described in this study).

MLST was performed for 25 strains (including one isolate of each of the 21 different *spa*-types, and also 4 additional strains of *spa*-types t011 and t127). Ten different sequence types were identified (ST1, ST5, ST8, ST25, ST45, ST59, ST125, ST188, ST398, and ST627). Based on sequence type (ST) and/or *spa*-type detected, all MRSA-Tet^R were assigned to 9 MLST clonal complexes (number of strains/% of strains): CC398 (59/60.2%), CC1 (19/19.4%), CC5 (12/12.2%), and [CC6, CC8, CC25, CC45, CC59 and CC188] (8/8.2%).

The *agr*-types detected were (number of strains): *agr* I (67), *agr* II (12), and *agr* III (20). All strains were SCC*mec*-typed and 66.3% of them showed SCC*mec* V, 32.6% of them harboured SCC*mec* IV, and 1.1% were non-typeable (Tables 1–3).

Fifty-nine CC398 strains were detected among the 98 MRSA-Tet^R of this study (60.2%). If we consider the total MRSA strains of the studied period (749 strains), the percentage of MRSA CC398 (59 strains) would be at least of 7.9%; this percentage could be even higher in case that CC398 strains were detected among

Table 1
Characteristics of the 25 MRSA-Tet^R strains of patients that referred livestock-contact (group-A).

No. of strains	I/C[a]	Molecular typing			Antimicrobial resistance		Virulence factors	
		MLST/CC[b]	*spa*-type	*agr*/SCC*mec*	Phenotype[c,d]	Genotype[c]	IEC type[e]	Other genes[c]
12	7/5	ST398/CC398	t011	I/V	ERY^8, CLI^8, GEN^2, TOB^3, KAN^3, CIP^8	*tet(K)*^{10}, *tet(L)*^{2}, *tet(M)*, *msr(A)*^{1}, *msr(B)*^{1}, *mph(C)*^{1},*erm(A)*^{5}, *erm(B)*^{2}, *erm(C)*^{7}, *vga(A)*^{1}, *lnu(A)*^{3}, *ant(4′)-Ia*^{3}, *aph(3′)-IIIa*^{3}, *aac(6′)-Ie-aph(2″)*^{2}	Negative	*hlA*, *hlB*^{9}, *hlG*^{8}, *aur*^{9}, *cna*^{5}, *luk-DE*^{1}
3	0/3	ST398/CC398	t1255	I/V	ERY^2, CLI, GEN^2, TOB^2, KAN^2, CIP^1	*tet(K)*^{1}, *tet(L)*^{1}, *tet(M)*, *erm(B)*^{1}, *erm(C)*^{2}, *erm(T)*^{1},*vga(A)*^{2},*lnu(A)*, *ant(4′)-Ia*^{2},*aph(3′)-IIIa*^{2}, *aac(6′)-Ie-aph(2″)*^{2}	Negative	*hlA*,*hlB*, *hlG*, *aur*, *cna*^{2}
4	2/2	ST398/CC398	t1451(3), t1456(1)	I/V	ERY^2, CLI^2, CIP	*tet(K)*^{2}, *tet(L)*^{2}, *tet(M)*, *erm(C)*^{2}, *vga(A)*^{2}	Negative	*hlA*, *hlB*, *hlG*, *aur*, *cna*^{2}
5	3/2	ST1/CC1	t127	III/IV	ERY^4, CLI	*tet(M)*^{1}, *tet(K)*^{1}, *tet(L)*^{3}, *erm(A)*^{3}, *erm(C)*^{4}, *vga(A)*^{1}	E	*hlA*^{2}, *hlB*^{3}, *hlG*^{1},*hlGv*^{3}*aur*^{4}, *cna*^{3}, *luk-DE*^{4}
1	0/1	ST5/CC5	t2220	II/IV	ERY, CIP, SXT^1	*tet(K)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *mph(C)*	F	*hlA*, *hlB*, *hlGv*, *aur*, *luk-DE*

[a] I: strains from infection samples; C: strains of nasal or pharyngeal samples associated with colonization.
[b] At least one strain of each *spa* type was submitted to MLST-typing and the STs and CCs were assigned for all strains of the same *spa*-type.
[c] Superscript marks the number of strains in those cases in which not all strains of the group have the indicated characteristic.
[d] Antimicrobials: ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.
[e] IEC: immune evasion cluster. IEC type E (*scn, sak*) and IEC type F (*scn, chp, sak, sep).*

Table 2
Characteristics of the 42 MRSA-Tet^R strains of patients that refer no livestock-contact (group-B).

No. of strains	I/C[a]	Molecular typing			Antimicrobial resistance		Virulence factors	
		MLST/CC[b]	*spa*-type	*agr*/SCC*mec*	Phenotype[c,d]	Genotype[c]	IEC type[c,e]	Other genes[c]
18	10/8	ST398/CC398	t011	I/V	ERY^9, CLI^9, CIP^{11}	*tet(K)*^{11}, *tet(L)*^{9}, *tet(M)*^{17}, *msr(A)*^{2}, *msr(B)*^{1},*mph(C)*^{1}, *erm(B)*^{2}, *erm(C)*^{5}, *vga(A)*^{5}	Negative	*hlA*^{11}, *hlB*^{10}, *hlG*^{12}, *aur*^{13}, *cna*^{12}, *luk-DE*^{1}
2	2/0	ST398/CC398	t1451	I/V	ERY, CLI, CIP	*tet(K)*^{1}, *tet(M)*, *erm(C)*^{2}, *vga(A)*^{1}, *lnu(A)*^{1}	Negative	*hlA*, *hlB*, *hlG*, *aur*, *cna*, *luk-DE*^{1}
1	1/0	ST398/CC398	t1197	I/V	PEN	*tet(K)*, *tet(L)*	Negative	*aur*, *cna*
9	5/4	ST1/CC1	t127(8), t1784(1)	III/IV	ERY, CLI^7, CIP^1	*tet(K)*^{6}, *tet(L)*^{3},*tet(M)*^{1}, *msr(A)*^{2}, *msr(B)*^{2}, *mph(C)*^{2}, *erm(C)*^{6}	E	*hlA*^{7}, *hlB*^{8}, *hlGv*^{8}, *aur*^{8}, *cna*^{8}, *luk-DE*^{6}
5	4/1	ST125/CC5	t067	II/IV	ERY^5, CLI^4, GEN^1, TOB^2, KAN^2, CIP^4	*tet(K)*, *msr(A)*^{4}, *msr(B)*^{4}, *mph(C)*^{4}, *erm(B)*^{3}, *erm(C)*^{2}, *ant(4′)-Ia*^{2}, *aph(3′)-IIIa*^{2}, *aac(6′)-Ie-aph(2″)*^{1}	F^4 or G^1	*hlA*^{4}, *hlB*^{3}, *hlGv*, *aur*^{5},*luk-DE*^{5}
1	1/0	ST5/CC5	t002	II/IV	CLI, CIP	*tet(K)*, *lnu(A)*	F	*hlA*, *hlB*, *hlG*, *aur*, *luk-DE*
1	0/1	ST8/CC8	t024	III/V	ERY, CLI	*tet(K)*, *erm(B)*, *erm(C)*	E	*hlA*, *hlB*, *hlGv*, *aur*, *cna*, *luk-DE*
1	1/0	ST8/CC8	t10664	I/IV	CLI, CIP, SXT	*tet(K)*, *dfr(S1)*	D	*hlA*, *hlB*, *hlGv*, *aur*, *luk-DE*
1	1/0	ST25/CC25	t167	I/NT	ERY, GEN, TOB, KAN, CIP	*ant(4′)-Ia*, *aph(3′)-IIIa*, *aac(6′)-Ie-aph(2″)*	B	*hlA*, *hlB*, *hlGv*, *aur*, *luk-DE*
1	1/0	ST6/CC6	t701	I/V	CIP	*tet(M)*	Negative	*hlA*, *hlB*, *hlGv*, *aur*, *cna*, *luk-DE*
1	1/0	ST59/CC59	t216	I/IV	Negative	*tet(K)*	Negative	*hlA*, *hlB*, *hlGv*
1	1/0	ST45/CC45	t1618	I/V	ERY	*tet(M)*, *msr(A)*, *mph(C)*	Negative	*aur*, *cna*

[a] I: strains from infections samples; C: strains of nasal or pharyngeal samples associated with colonization.
[b] At least one strain of each *spa* type was submitted to MLST-typing and the ST and CC were assigned for all strains of the same *spa*-type. NT, non typeable.
[c] Superscript marks the number of strains in those cases in which not all strains of the group have the indicated characteristic.
[d] Antimicrobials: ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.
[e] IEC: Immune Evasion Cluster. IEC type B (*scn, chp*, sak), IEC type D (*scn, sak, sea)*, IEC type E (*scn, sak*), IEC type F (*scn, chp, sak, sep*), IEC type G (*scn, sak, sep*).

Table 3
Characteristics of 31 MRSA-Tet^R strains of patients with no data related with animal-contact (group-C).

No. of strains	I/C[a]	Molecular typing			Antimicrobial resistance		Virulence factors	
		MLST/CC[b]	*spa*-type	*agr*/SCC*mec*	Phenotype[c,d]	Genotype[c]	IEC type[e]	Other genes[c]
14	6/8	ST398/CC398	t011	I/V	ERY^9, CLI^{11}, CIP^2, MUP^1, FUS^1	*tet(K)*^{10}, *tet(L)*^{10}, *tet(M)*^{11}, *erm(C)*^{9}, *vga(A)*^{3}, *lnu(A)*^{1}, *fus(C)*^{1}, *mup(A)*^{1}	Negative	*hlA*^{12}, *hlB*^{10}, *hlG*^{11}, *aur*^{11}, *cna*^{13}
1	0/1	ST398/CC398	t1255	I/V	ERY, CLI, CIP	*tet(K), tet(M), erm(C), lnu(A), erm(B)*	Negative	*hlA, hlB, hlG, aur, cna, luk-DE*
1	1/0	ST398/CC398	t899	I/IV	Negative	*tet(K), tet(L), tet(M)*	Negative	*hlA, hlB, hlGv, aur, cna*
3	2/1	ST398/CC398	t1451, t1606, t1197	I/V	ERY^1, CLI^1, CIP^1	*tet(K), tet(M), erm(C)*^{1}	Negative	*hlA, hlB, hlGv, aur*^{1}, *cna*^{1}
5	4/1	ST1/CC1	t127	III/IV	ERY, CLI, TOB^1, KAN^1	*tet(K)*^{4}, *tet(L)*^{2}, *tet(M)*^{1}, *msr(A)*^{1}, *msr(B)*^{1}, *mph(C)*^{1}, *erm(A)*^{1}, *erm(C)*^{4}, *vga(A)*^{1}, *ant(4′)-Ia*^{1}, *aph(3′)-IIIa*^{1}	E	*hlA, hlB*^{3}, *hlGv*^{4}, *aur, cna*^{3}, *luk-DE*^{4}
2	2/0	ST125/CC5	t067	II/IV	ERY^1, CLI^1, TOB^1, KAN, CIP^1	*tet(K)*^{1}, *tet(L)*^{1}, *tet(M)*^{1}, *msr(A)*^{1}, *msr(B)*^{1}, *mph(C)*^{1},*erm(B)*^{1}, *erm(C)*^{1}, *ant(4′)-Ia*^{1}, *aph(3′)-IIIa*	F	*hlA, hlB*^{1}, *hlGv*^{1}, *aur*^{1}, *cna*^{1}, *luk-DE*
1	0/1	ST5/CC5	t688	II/V	Negative	*tet(M)*	G	*hlA, hlB, hlGv, aur, luk-DE*
1	0/1	ST5/CC5	t2220	II/V	CIP, GEN, TOB, KAN, MUP	*tet(K), aac(6′)-Ie-aph(2″), mup(A)*	F	*hlA, hlGv, aur, luk-DE*
1	1/0	ST627/CC5	t1594	II/IV	GEN, TOB, KAN	*aac(6′)-Ie-aph(2″), aph(3′)-IIIa*	F	*hlA, aur, luk-DE*
2	2/0	ST188/CC188	t5229	I/V	CLI, CIP^1	*tet(K), tet(L), vga(A)*	F	*hlA,hlB, hlGv*^{1}, *aur, cna, luk-DE*^{1}

[a] I: strains from infections samples; C: strains of nasal or pharyngeal samples associated with colonization.
[b] At least one strain of each *spa* type was submitted to MLST-typing and the ST and CC were assigned for all strains of the same *spa*-type.
[c] Superscript marks the number of strains in those cases in which not all strains of the group have the indicated characteristic.
[d] Antibiotics: ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; MUP, mupirocin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; FUS, fusidic acid.
[e] IEC: Immune Evasion Cluster. IEC type E (*scn, sak*); IEC type F (*scn, chp, sak, sep*) and IEC type G (*scn, sak, sep*).

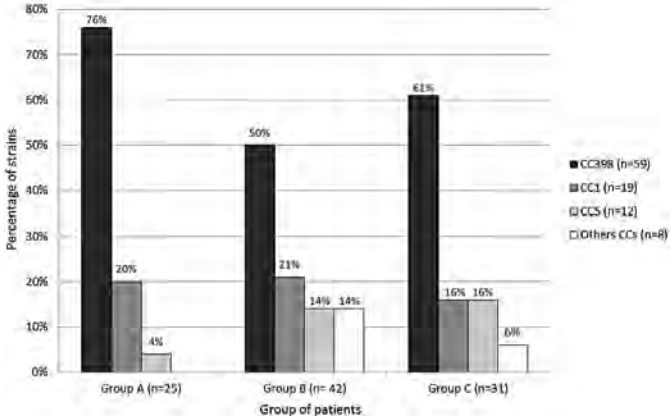


Fig. 1. Percentage of MRSA-Tet^R strains related to clonal complexes in the three studied groups: (A) livestock-contact; (B) no livestock-contact; (C) no data respect to animal-contact. The percentage of the strains is indicated above the bars.

MRSA-tetracycline susceptible (MRSA-Tet^S) strains (non-typed in this study).

Strains detected according to the livestock-contact status

Fig. 1 shows the distribution of CCs among isolates derived from the three groups of patients (A–C). A significant higher rate of CC398 was observed in the group A with livestock-contact (76%) in relation to group B with no livestock-contact (50%) ($p < 0.05$). On the other way, comparing group A vs B, a similar rate of CC1 was observed in both groups (20% vs 21.4%) and a lower rate of CC5 strains in group A (4% vs 14.3%). If we only consider the MRSA-Tet^R strains corresponding to clinical infections (excluding colonization ones), the proportion of CC398 among strains of group A (9 of 12 strains, 75%) was also significantly higher than among those of group B (13 of 28 strains, 46%) ($p < 0.05$).

Origin of the strains and clonal complexes

The origin of the MRSA-Tet^R strains according to their CCs is shown in Fig. 2. CC398 strains were mainly obtained from colonization samples of screening studies (nasal and pharyngeal samples), from samples of skin and soft-tissue infections (SSTI), and respiratory-tract infections. The majority of the CC1 and CC5 strains were obtained from samples of SSTIs.

Phenotype of resistance detected in MRSA-Tet^R of lineages CC398, CC1 and CC5

More than half of CC398 strains presented resistance to erythromycin, clindamycin, and ciprofloxacin. CC1 strains showed very high percentage of erythromycin/clindamycin resistance but most of them showed susceptibility for the remaining

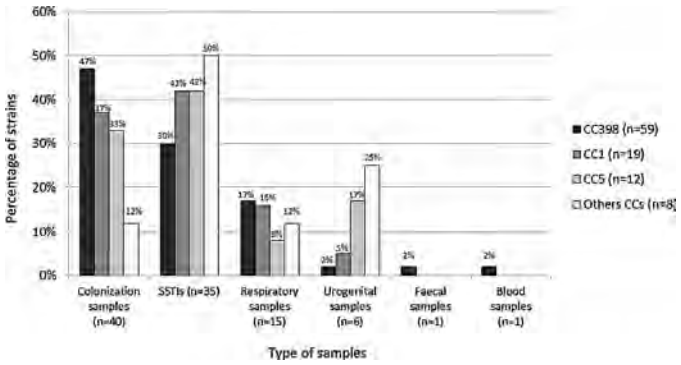


Fig. 2. Percentage of MRSA-Tet^R strains in relation with the type of samples from which they were recovered (colonization samples: nasal or pharyngeal screening samples; SSTIs: samples of skin and soft tissues infections; Urogenital samples: samples of urine or urethral and vaginal tissues) and with their clonal complexes. The percentage of the strains is indicated above the bars.

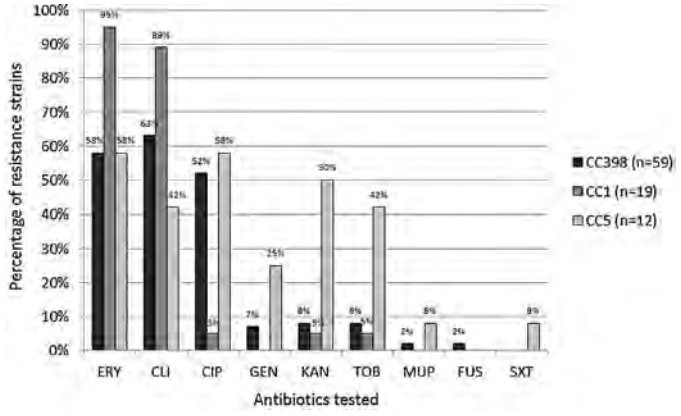


Fig. 3. Percentage of MRSA-Tet^R strains showing resistance to different antibiotics in relation with the predominant clonal complexes (CC398, CC1, and CC5) (ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; MUP, mupirocin; FUS, fusidic acid; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole). The percentage of the strains is indicated above the bars.

antibiotics. Most of CC5 strains showed ciprofloxacin-resistance (58%), and rates of 25–50% of aminoglycoside resistance were identified (Fig. 3). All strains showed susceptibility for vancomycin, teicoplanin, and linezolid.

Genotype of resistance detected in MRSA-Tet^R of lineages CC398, CC1 and CC5

The MRSA-Tet^R strains ascribed to CC398 showed a high prevalence of *tet*(M) gene (almost 90% of strains), in comparison with strains of CC1 or CC5 lineages. The *lnu(A)* and *vga(A)* genes, associated with lincosamide-resistance, were relatively frequent among MRSA-CC398 strains (15% and 24%, respectively). On the other hand, the genes *msr(A)*, *msr(B)*, and *mph(C)* (conferring resistance to erythromycin), and those conferring resistance to aminoglycosides were highly represented among the CC5 strains. One mupirocin-resistant CC398 strain carried the *mup(A)* gene and one fusidic-acid-resistant CC398 strain the *fusC* gene (Fig. 4).

Virulence genes detected

The genes of the Panton-Valentine leukocidin, toxic shock syndrome toxin or exfoliative toxins were not detected among the strains of this study. Different combinations of hemolysin genes were identified in our collection of MRSA-Tet^R, and other virulence genes, such as *cna*, *luk-DE* or *aur* were detected in some of the strains (Tables 1–3).

Analysis of IEC genes

The genes of the IEC system were not detected in the MRSA-Tet^R strains of the lineages CC398, CC6, CC45, and CC59. Nevertheless, different IEC types were identified among the MRSA-Tet^R of the remaining lineages (CC/IEC type): CC1/IEC-E, CC5 and CC188/IEC-F or G, CC8/IEC-E or D, and CC25/IEC-B (Tables 1–3).

Discussion

Tetracycline resistance has been considered as a good phenotypic marker for the detection of MRSA of CC398 lineage and other animal-related CCs (Camoez et al., 2013; Lozano et al., 2012b). In a previous study, we analyzed the MRSA-Tet^R strains isolated during 2009–2010 in the same hospital, including isolates implicated in infections and also in nasal colonization (Lozano et al., 2012b); the prevalence of CC398 among the total MRSA in that period was 5.2%, slightly lower than the prevalence detected in the present study with similar type of isolates but different period (2011–2012) (7.9%). Nevertheless, we should point out that in the previous study and in the present one, the MRSA-Tet^S strains were not MLST-typed, and for this reason, we cannot discard the existence of MRSA CC398 among MRSA-Tet^S strains, and in that case the percentages could be higher. The apparently increasing trend in the proportion of MRSA CC398 detected in our study, has also been previously detected in other hospitals of Germany and Spain (Camoez et al., 2013; Köck et al., 2013). A possible explanation of the high prevalence of CC398 strains among MRSA of our hospital might be the fact that the analyzed geographic area in our study and in the German report correspond to high density pig-farming areas.

For this reason, we decided to study the possible contact of the patients with livestock-animals to establish its possible association with the detection of MRSA-CC398. Nevertheless, CC398 strains were detected in MRSA-Tet^R of groups-A and -B, with and without livestock-contact, respectively (this lineage was also detected in group-C, with no data about animal-contact). A significant higher value was obtained in the group-A than in the group-B, either if we consider all MRSA-Tet^R strains (clinical and epidemiological ones) (76% vs 50%), or only those implicated in human infections (75% vs 46%). However, it is interesting also to remark the high prevalence of CC398 among the MRSA-Tet^R of the group-B. In some previous studies, the MRSA CC398 transmissibility in humans in hospital environments has been studied (Hetem et al., 2013; Wassenberg et al., 2011). They concluded that the transmission of LA-MRSA in healthcare settings is possible but lower than for other MRSA lineages. It is remarkable that, a CC398 clade consisting in methicillin susceptible strains seems to be easily transmittable between humans. However, these strains present very different characteristics, MSSA-t571-CC398 being the more representative one (David et al., 2013; McCarthy et al., 2012; Price et al., 2012). In any case, in spite of that the human-to-human transferability of MRSA CC398 appears to be low, some hospital outbreaks of MRSA CC398 strains have also been detected (Verkade et al., 2012). According to our results, it seems to be an association between livestock-contact and MRSA-CC398 infection/colonization, due to the significant high percentage observed in this group; nevertheless, the parallel considerable detection of CC398 in group-B could indicate the potential human-to-human transmissibility. This possible capacity of transmission of CC398 among humans would represent an important risk for public health, mainly if it occurs in hospital environments. In our study, it was not possible to determine if human-to-human transmission of MRSA-CC398 occurred in the hospital setting or if patients were previously colonized by MRSA-CC398 before

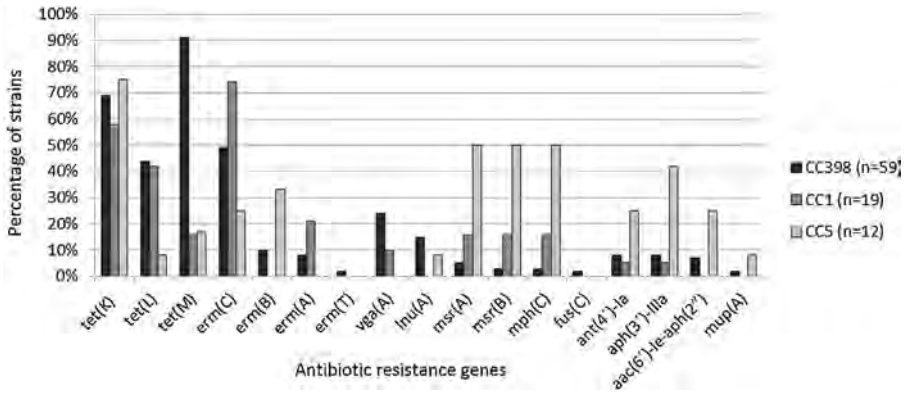


Fig. 4. Antibiotic resistance genes detected in MRSA-Tet^R strains in relation with the predominant clonal complexes (CC398, CC1, and CC5).

admission in the hospital. Active surveillance of MRSA carriage at hospital admission is not performed in a routinary way.

MRSA-CC398 generally present less virulence factors such as PVL, TSST, exfoliative toxins or enterotoxins when it is compared to other CCs (Lozano et al., 2012a). However, in some cases, these genes have been detected (Argudín et al., 2011; Williamson et al., 2014) and severe infection cases (endocarditis, pneumonia, bacteraemia) have been described (Lozano et al., 2011). Moreover, MRSA strains belonging to CC398 can present a multi-resistance phenotype, which severely limits the therapeutic options (Cuny et al., 2013). So, it has been suggested that MRSA-CC398 strains can act as antibiotic resistance gene reservoir (Kadlec et al., 2012). Among our 59 MRSA-CC398 strains, we found 47 strains (79.6%) with a multi-resistance phenotype (resistance to three or more antimicrobial families, in addition to beta-lactams). High percentages of resistance were found for erythromycin, clindamycin, and ciprofloxacin. Similar results were found in the previous study in this hospital (Lozano et al., 2012b), and resistance to these antimicrobials has been detected in CC398 in other studies (Vanderhaeghen et al., 2010). Remarkably, in the case of quinolones, the detection of CC398 strains resistant to this antimicrobial family is less habitual (Cuny et al., 2013). It is essential to remark that macrolides and quinolones, together with tetracyclines, are classified in the category "*critically important in human medicine*" according to WHO classification and, therefore, it is advisable to reduce the use of these antimicrobials in animals (Collignon et al., 2009).

The variant of *tet* gene detected in higher proportion on the MRSA-CC398 strains was *tet(M)* although, in many of the strains, a combination of different *tet* genes was identified. This is in accordance with the results obtained in other studies (Argudín et al., 2011; Feßler et al., 2011; McCarthy et al., 2012). Moreover, the macrolide-lincosamide resistance was mainly mediated by *erm(C)* which is very frequent in MRSA strains of CC398 lineage (Cuny et al., 2013). In a few strains, other macrolide and/or lincosamide resistance genes were identified which is less common in MRSA CC398 (Argudín et al., 2011). Interestingly, some strains presented the phenotype of macrolide-susceptibility/lincosamide-resistance mediated by *lnu(A)* and/or *vga(A)*. It is thought that this phenotype is associated with animal clonal lineages of *S. aureus* (Lozano et al., 2012a). In a few CC398 strains, resistance to gentamicin, tobramycin, mupirocin, or fusidic acid was detected. These resistances are infrequent in this clonal lineage especially the fusidic acid and mupirocin resistance since there is almost uniform susceptibility for these antimicrobials (Chua et al., 2011). In fact, until our knowledge, the gene *fus(C)* had not been detected before in CC398 strains (Kadlec et al., 2012).

Strains of other CCs were detected. So, CC1 was identified in 19 strains and this CC corresponded to 20% of the patients with livestock-contact (group-A) and 21% of the patients without livestock-contact (group-B). This clonal lineage seems to have a wide host range (Cuny et al., 2013). So, strains belonging to CC1 have been detected in hospital environments (Monaco et al., 2013), and in different farm animals (Franco et al., 2011). It has been hypothesized that CC1-t127 strains could be assigned to two genetically different clusters (porcine and human), CC1-t127 representing another clonal lineage of LA-MRSA (Franco et al., 2011). The CC1 strains showed higher percentages of erythromycin and clindamycin resistance than CC398 strains. This resistance was mediated by the *erm(C)* gene in most of our CC1 strains. This gene, in combination with *erm(A)* gene, has been already detected in strains of this clonal lineage (Franco et al., 2011).

Regarding to CC5 which was found in 12 strains, this clonal lineage is mainly found in Spanish hospitals (Lozano et al., 2013; Pérez-Roth et al., 2013). The lineage CC5 is characterized by ciprofloxacin, tobramycin/kanamycin and erythromycin resistance (Lozano et al., 2013), which is in accordance with our results.

None of the strains included in this study presented the genes encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL), toxic shock syndrome toxin, or exfoliative toxins. The absence of these toxin genes is common in CC398 strains. However, some cases of MRSA CC398 strains harbouring PVL genes have been described (Williamson et al., 2014).

Interestingly, the CC398 strains did no present the genes of the IEC system. Two clusters of CC398 have been identified and the lack of IEC genes seems to be associated with an animal reservoir (Uhlemann et al., 2012). In contrast, one characteristic of CC1 strains of human cluster is that these strains present the gene *sak* (Franco et al., 2011; Monaco et al., 2013). This gene was identified in our CC1 strains (IEC type E), which suggest that, in this case, our strains might belong to the human clade.

Conclusion

CC398 strains are very frequently detected among MRSA-Tet^R strains in the studied hospital (60.2%). Although CC398 lineage was detected in significant higher proportion in patients with livestock-contact than in those with no livestock-contact (76% vs 50%), its considerable prevalence in the second group indicates the capacity of human-to-human transmission of this clonal lineage, even in absence of this risk factor. All of these data should be taken into account, especially because this microorganism is highly capable of capturing multiple antibiotic resistance genes.

Acknowledgements

This work was supported by Project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Daniel Benito has a

predoctoral fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and Carmen Lozano is financed by project SAF2012-35474.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.004.

References

Argudín, M.A., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Sachsenröder, J., Käsbohrer, A., Schroeter, A., 2011. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3052–3060.

Armand-Lefevre, L., Ruimy, R., Andremont, A., 2005. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. Emerg. Infect. Dis. 11, 711–714.

Benito, D., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Torres, C., 2013. Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. Microb. Ecol. 66, 105–111.

Camoez, M., Sierra, J.M., Pujol, M., Hornero, A., Martin, R., Domínguez, M.A., 2013. Prevalence and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. PLoS One 8, e72828.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty third informational supplement. In: M100-S23. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Chua, K., Laurent, F., Coombs, G., Grayson, M.L., Howden, B.P., 2011. Antimicrobial resistance: not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A clinician's guide to community MRSA – its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. Clin. Infect. Dis. 52, 99–114.

Collignon, P., Powers, J.H., Chiller, T.M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F.M., 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food productions animals. Clin. Infect. Dis. 49, 132–141.

Cuny, C., Köck, R., Witte, W., 2013. Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. Int. J. Med. Microbiol. 303, 331–337.

David, M.Z., Siegel, J., Lowy, F.D., Zychowski, D., Taylor, A., Lee, C.J., et al., 2013. Asymptomatic carriage of sequence type 398, *spa* type t571 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an urban jail: a newly emerging, transmissible pathogenic strain. J. Clin. Microbiol. 51, 2443–2447.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2014. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, ⟨http://www.eucast.org⟩.

Franco, A., Hasman, H., Iurescia, M., Lorenzetti, R., Stegger, M., Pantosti, A., et al., 2011. Molecular characterization of *spa* type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. J. Antimicrob. Chemother. 66, 1231–1235.

Feßler, A.T., Kadlec, K., Hassel, M., Hauschild, T., Eidam, C., Ehricht, R., et al., 2011. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. Appl. Environ. Microbiol. 77, 7151–7157.

Garcia-Graells, C., Antoine, J., Larsen, J., Catry, B., Skov, R., Denis, O., 2012. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. Epidemiol. Infect. 140, 383–389.

Hetem, D.J., Bootsma, M.C., Troelstra, A., Bonten, M.J., 2013. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 19, 1797–1802.

Kadlec, K., Feßler, T., Hauschild, T., Schwarz, S., 2012. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 18, 745–755.

Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Köksal, M., Jurke, A., Becker, K., et al., 2013. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. PLoS One 8, e55040.

Lozano, C., Aspiroz, C., Ezpeleta, A.I., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Torres, C., 2011. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. Emerg. Infect. Dis. 17, 138–140.

Lozano, C., Aspiroz, C., Sáenz, Y., Ruiz-García, M., Royo-García, G., Gómez-Sanz, E., et al., 2012a. Genetic environment and location of the *lnu*(A) and *lnu*(B) genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2804–2808.

Lozano, C., Rezusta, A., Gómez, P., Gómez-Sanz, E., Báez, N., Martin-Saco, G., et al., 2012b. High prevalence of *spa* types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. J. Antimicrob. Chemother. 67, 330–334.

Lozano, C., Porres-Osante, N., Crettaz, J., Rojo-Bezares, B., Benito, D., Olarte, I., et al., 2013. Changes in genetic lineages, resistance, and virulence in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. J. Infect. Chemother. 19, 233–242.

McCarthy, A.J., van Wamel, W., Vandendriessche, S., Larsen, J., Denis, O., Garcia-Graells, C., et al., 2012. Staphylococcus aureus CC398 clade associated with human-to-human transmission. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8845–8848.

Monaco, M., Pedroni, P., Sanchini, A., Bonomini, A., Indelicato, A., Pantosti, A., 2013. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming. BMC Infect. Dis. 13, 258.

Pérez-Roth, E., Potel-Alvarellos, C., Espartero, X., Constela-Caramés, L., Méndez-Álvarez, S., Alvarez-Fernández, M., 2013. Molecular epidemiology of plasmid-mediated high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in four Spanish health care settings. Int. J. Med. Microbiol. 303, 201–204.

Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P.S., et al., 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio 21, 3, e00305–e311.

Uhlemann, A.C., Porcella, S.F., Trivedi, S., Sullivan, S.B., Hafer, C., Kennedy, A.D., et al., 2012. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. mBio 28, 3.

VanCleef, B.A., Monnet, D.L., Voss, A., 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans. Eur. Emerg. Infect. Dis. 17, 502–505.

Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2010. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. Epidemiol. Infect. 138, 606–625.

Van Wamel, W.J., Rooijakkers, S.H., Ruyken, M., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. J. Bacteriol. 188, 1310–1315.

Verkade, E., Bosch, T., Hendriks, Y., Kluytmans, J., 2012. Outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch nursing home. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 33, 624–626.

Wassenberg, M.W., Bootsma, M.C., Troelstra, A., Kluytmans, J.A., Bonten, M.J., 2011. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. Clin. Microbiol. Infect. 17, 316–319.

Williamson, D.A., Bakker, S., Coombs, G.W., Tan, H.L., Monecke, S., Heffernan, H., 2014. Emergence and molecular characterization of clonal complex 398 (CC398) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in New Zealand. J. Antimicrob. Chemother. 69, 1428–1430.

Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J.M., 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 43, 5026–5033.

Microb Ecol (2013) 66:105–111
DOI 10.1007/s00248-013-0240-1

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

Detection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 Strains in Gut Microbiota of Healthy Humans in Spain

Daniel Benito · Carmen Lozano · Elena Gómez-Sanz · Myriam Zarazaga · Carmen Torres

Received: 27 March 2013 / Accepted: 25 April 2013 / Published online: 8 May 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Fecal samples of 100 healthy humans were tested for *Staphylococcus aureus* recovery. Fifteen samples (15 %) contained *S. aureus*, all methicillin-susceptible (MSSA), being one isolate/sample further studied. These 15 isolates were characterized by *spa* and *agr* typing as well as multilocus sequence typing. High diversity of *spa* types (n=11) and sequences types (n=8) was detected. Two *S. aureus* of lineages ST398 or ST133 were detected, and six isolates were ascribed to clonal complex 30 (CC30). Strains were susceptible to most of the 17 antimicrobial agents tested with exceptions: erythromycin/clindamycin (three strains, containing *erm*(C) and/or *erm*(A) + *mph*(C) genes) and tobramycin and mupirocin (one strain containing *ant*(4′)-Ia + *mup*(A) genes). The presence of 18 staphylococcal enterotoxin genes was studied by PCR, and isolates were negative for *lukF*/*lukS*-PV genes, although strain ST133 harbored the *lukD-lukE* + *lukM* genes. Other virulence genes detected were (number of strains): *tsst-1* (6), *hla* (15), *hlb* (9), *hld* (15), *hlg* (6), *hlgv* (9), *cna* (2), *aur* (14), and *egc*-like cluster (3). Analysis of immune evasion cluster genes showed six types, highlighting their absence in two strains of lineages ST133 and ST5. A high clonal diversity of MSSA strains was identified in the intestinal microbiota of healthy humans, being CC30 the most frequent one. This is the first report of MSSA ST133 and ST398 isolates in gut microbiota of healthy humans.

D. Benito · C. Lozano · E. Gómez-Sanz · M. Zarazaga · C. Torres (✉)
Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51,
26006 Logroño, Spain
e-mail: carmen.torres@unirioja.es

Introduction

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen commonly found as part of the normal human microbiota, especially of the oropharynx, nose and skin, although it can also colonize the intestine and the perineal region. Most studies that analyze the *S. aureus* fecal colonization are referred to hospitalized patients [1, 18, 19, 38, 49], with different percentages reported depending on the studies, and very few reports are focused on fecal samples of healthy individuals [12]. In addition, very scarce data do exist on the molecular characterization of fecal *S. aureus* isolates of healthy humans. It is known that *S. aureus* colonization can precede infection and that it can adapt to different body sites [45]. *S. aureus* can also acquire different resistance mechanisms, highlighting the acquisition of the *mecA* gene, given that it confers resistance to almost all available beta-lactams [22]. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) can affect both hospitalized patients as well as patients from the community (CA-MRSA). In the last years, a new MRSA lineage (namely ST398, which is associated with farm animals, especially pigs) [14, 16] has emerged. Some other *S. aureus* genetic lineages are also associated with animals, such as ST133, which is mainly related to ungulates and ruminants [15, 41]. There is an increasing interest in the analysis of the circulating *S. aureus* genetic lineages in different ecosystems in order to determine the flux of lineages among different niches and their potential evolution.

S. aureus is also important due to its capacity to produce a large variety of virulence factors that can exacerbate the clinical situation of staphylococcal infections [25]. Some of these toxins are Panton–Valentine leukocidin (PVL), toxic

shock syndrome toxin 1 (TSST-1), different hemolysins, enterotoxins, exfoliatins, and other virulence factors which facilitate cellular invasion, bacterial growth, and reduction of immune system human cells [9, 25, 40, 47].

S. aureus can acquire genes that seem to be associated with the capacity of this microorganism to evade the human immune system. This set of genes is called immune evasion cluster (IEC). The IEC system is located on an 8-kb region at the conserved 3′ end of β-hemolysin-converting bacteriophages. This region contains the genes *scn*, *chp*, *sak*, and *sea* or *sep*, which have different functions to achieve the survival of *S. aureus* within our innate defenses. The presence of different combinations of these genes in *S. aureus* allows its classification into different IEC types [39, 47].

The aims of this study are to determine the rate of *S. aureus* fecal carriage in healthy humans and to analyze the genetic lineages, the resistance genes and virulence determinants of recovered isolates. Furthermore, we focused on the determination of the IEC types to hypothesize on the possible human or animal origin of isolates.

Materials and Methods

Bacterial Isolation

Fecal samples of 100 healthy human volunteers were obtained during September 2010 and March 2011 in La Rioja (northern Spain). Healthy humans (age range 2–89 years; 53 % women and 47 % men) had neither received antibiotics nor had relation with the hospital environment for at least 3 months prior to sampling, and all gave their informed consent (or their parents in case of underage) to participate in this study. Direct suspension of the fecal swabs was performed in sterile saline solution, and 100 μL was inoculated into brain–heart infusion broth containing 6.5 % NaCl and incubated at 37 °C for 24 h. Then, 100 μL of this culture was seeded on mannitol–salt agar (MSA, Beckton–Dickinson), and oxacillin resistance screening agar base (ORSAB), OXOID) supplemented with 2 mg/L of oxacillin, and the plates were incubated at 37 °C for 24–36 h. Presumptive *S. aureus* and MRSA colonies were selected in MSA (yellow colonies) and ORSAB plates (blue colonies), respectively (two per positive plate). Identification of *S. aureus* and MRSA was performed by conventional methods (DNAse assay, catalase, and Gram staining) and confirmed by specific duplex PCR of the *nuc* (*S. aureus* specific thermonuclease) and *mecA* (staphylococci methicillin-resistance determinant) genes [30]. *S. aureus* isolates were stored at −80 °C until further analysis. All isolates were tested for their capacity to coagulate the bovine plasma (Sigma–Aldrich) following standard methodology [20].

Molecular Typing of Isolates

S. aureus isolates were characterized by different molecular methods. Single-locus DNA sequencing of the hyper variable region of *S. aureus* protein A (*spa*) [21] was performed, and the obtained sequences were analyzed using the Ridom StaphType software version 1.5.21 (Ridom GmbH). Detection of *agr* allotypes—accessory gene regulatory loci—was carried out by two multiplex PCR [43] in all isolates. Multi-locus sequence typing (MLST) was also performed in all *S. aureus* isolates to determine the sequence type (ST) and the clonal complex (CC) of each isolate (www.saureus.mlst.net).

Susceptibility Testing and Detection of Antimicrobial Resistance Genes

Susceptibility testing was carried out by disk-diffusion agar method for 17 antimicrobials (penicillin, oxacillin, cefoxitin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, tobramycin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim–sulfamethoxazole, linezolid, vancomycin, mupirocin, and fusidic acid) following the CLSI recommendations [7, 8], except for fusidic acid, mupirocin, and streptomycin for which SFM guidelines were followed [6]. In addition, the D-test was performed for the detection of inducible clindamycin resistance [7]. The presence of the *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(T), *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *ant*(4′)-Ia, *mup*(A), and *blaZ* resistance genes was studied by PCR (and sequencing for some of the amplicons) [17, 30, 42, 44].

Detection of Virulence Genes

The presence of the genetic determinants of the Panton–Valentine leukocidin (*lukF/lukS*-PV), toxic shock syndrome toxin (*tsst-1*), exfoliative toxin A (*eta*), B (*etb*), and D (*etd*), as well as alpha-(*hla*), beta-(*hlb*), delta-(*hld*), gamma (*hlg*), and gamma-hemolysin variant (*hlgv*) was investigated by PCR. In addition, the genes encoding leukocidins DE (*lukD-lukE*) and M (*lukM*), aureolysin (*aur*), the biofilm-associated protein *bap*, and the adhesion factor *cna* were also studied by PCR [9, 25, 28, 30, 31, 40, 50, 51]. Eighteen staphylococcal enterotoxin genes (SEs) (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, and *seu*) were analyzed by PCR and PCR multiplex [23].

Immune Evasion Cluster

The five genes of the IEC cluster (*scn*, *chp*, *sak*, and *sea* or *sep*) were studied by PCR and sequencing; according to their presence or absence, *S. aureus* isolates were classified into seven IEC types following previously described patterns [47].

Results

Fecal Carriage and Molecular Typing of *S. aureus*

Fifteen of the 100 tested fecal samples (15 %) were positive for *S. aureus* on MSA plates. As both isolates of each positive sample showed similar resistance phenotype and *spa* type, only one isolate was maintained and further studied. All 15 isolates were susceptible to oxacillin and cefoxitin, and were negative for *mec*A gene; therefore, they were MSSA. No MRSA isolates were recovered from ORSAB medium.

Complete characterization of the 15 MSSA isolates is shown in Table 1. A high diversity of *spa* types was detected (t002, t012, t021, t084, t136, t166, t209, t216, t571, and t3495), including a new *spa* type registered as t7866 in Ridom SpaServer. The detected *agr* allotypes were I, II, and III, grouping all isolates. The *S. aureus* isolates belonged to eight different sequence types that were included into seven different clonal complexes, highlighting the presence of strains typed as ST398 (*spa*-t571), ST133 (*spa*-t3495), and ST5 (*spa*-t002) ascribed to the clonal complexes CC398, CC133, and CC5, respectively. Other sequence types identified were (ST(*spa* type)/CC ascribed): ST30(t012 or t021)/CC30, ST34(t136, t7866 or t166)/CC30, ST59(t216)/CC59, ST15(t084)/CC15, and ST109(t209)/CC9. Forty percent of the strains were included within clonal complex CC30. These strains fell into two sequence types, ST30 and ST34. MSSA isolates lacked the ability to coagulate bovine plasma except the isolate typed as ST133(t3495)/CC133.

Susceptibility Testing and Detection of Antimicrobial Resistance Genes

Few antimicrobial resistance traits were identified among our strains. Nine of them showed penicillin resistance (carrying the *bla*Z gene), three strains erythromycin resistance (carrying the *erm*(A), *erm*(C), *erm*(T) or *mph*(C) genes], and one strain exhibited tobramycin and mupirocin resistance (carrying *ant*(4′)-Ia and *mup*(A) genes). Four strains were susceptible to all tested antimicrobial agents (Table 1).

Virulence Genes Detected

A high diversity of virulence genes was identified among the 15 *S. aureus* strains (Table 1). Interestingly, six strains contained the *tsst-1* toxin gene (40 %) and one strain harbored the exfoliative toxin A gene (*eta*). All MSSA strains carried the *hla* and *hld* genes. Other hemolysin genes detected were as follows (number of strains): *hlb* (nine), *hlg* (six), and *hlgv* (nine). The *lukD-lukE* genes were detected in five strains, and the *lukM* gene was identified in the strain CC133. All strains except the one ascribed to CC133 carried the *aur* gene, while only two strains (both belonging to CC30) were positive to *cna* gene. All strains were negative for the presence of the genes *lukF/lukS*-PV and *bap*. None of our strains harbored the enterotoxin gene cluster named *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, and *seo*); however, 20 % presented the enterotoxin genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *seu*, included in the enterotoxin gene cluster like (*egc*-like) operon [4, 24]. All *S. aureus* strains lacked *see* and *ser* enterotoxin genes (Table 1).

Analysis of Immune Evasion Cluster Genes

All *S. aureus* strains except two harbored the genes of the IEC system. Only the strain of lineage CC133 and one ascribed to CC5 did not present the IEC genes. The following IEC types were obtained in the remaining 13 MSSA (IEC type/ST–CC): IEC type A/ST30–CC30; IEC type B/ST34–CC30, ST59–CC59, or ST109–CC9; IEC type C/ST15–CC15, ST59–CC59 or ST398–CC398; IEC type E/ST34–CC30; IEC type F/ST5–CC5; and IEC type G/ST34–CC30. Six strains were ascribed to the IEC type A/ST30-CC30, IEC type B/ST34-CC30 and IEC type C/ST15-CC15. The IEC type D was not detected among our strains (Table 1).

Discussion

A moderate rate of *S. aureus* fecal carriage (15 %) was detected among the healthy humans in this study. Few reports of this type have been previously performed, and most of them were focused on intestinal *S. aureus* carriage in hospitalized patients, with occurrences ranging from 8 to 31 % [18, 19, 49]. There are very few studies on healthy individuals, and as far as we know, none on genetic lineages of *S. aureus* from the intestinal ecosystem of healthy people.

The few available studies that analyzed the prevalence of intestinal colonization by *S. aureus* found values ranging from 6 % in healthy children [12] to 20 % in people with various clinical situations [1]. The absence of MRSA detection in our study is of relevance, although low percentage of MRSA carriage rates (0–5 %) has been reported in previous studies in healthy children [12], or in people at the time of hospital admission [3, 13, 26]. However, a higher prevalence rate was detected among hospitalized patients in other study (24 %) [27]. One question would be if *S. aureus* is a passenger or a real colonizer of the intestinal tract. A previous study evaluated the frequency of nasal and extranasal MRSA carriage on patients admitted at a hospital, identifying a strong association of extranasal carriage with nasal MRSA colonization [3].

The high genetic diversity of *spa* types detected among our strains (11 different *spa* types, one of them new) is remarkable. Most of the *spa* types identified were related

Table 1 Characteristics of the 15 MSSA isolates from fecal samples of healthy humans recovered in this study

Isolate	Molecular typing				IEC		Antimicrobial resistance		Virulence factors	
	CC	ST	*spa*	*agr*	IEC type	Genes	Phenotype	Genes	SEs	Other genes
C3965	CC398	ST398	t571	I	C	*scn*, *chp*	ERY, CLI[a]	*erm*(T)	*sed*, *sen*	*hla*, *hld*, *hlgv*, *aur*
C3968	CC133	ST133	t3495	I	–	–	–	–	*sec*, *sej*, *sel*, *sen*	*tsst-1*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlgv*, *luk-DE*, *luk-M*
C3972	CC59	ST59	t216	I	B	*scn*, *chp*, *sak*	–	–	*sej*, *sen*	*tsst-1*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlgv*, *aur*
C3973	CC59	ST59	t216	I	C	*scn*, *chp*	PEN	*blaZ*	*seb*, *sej*, *sek*, *sen*, *seq*	*hla*, *hlb*, *hld*, *hlgv*, *aur*
C3969	CC30	ST30	t012	III	A	*scn*, *chp*, *sak*, *sea*	PEN	*blaZ*	*sea*, *sej*, [*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*][b]	*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *cna*, *aur*
C3970	CC30	ST30	t021	III	A	*scn*, *chp*, *sak*, *sea*	PEN	*blaZ*	*sea*, *sej*, [*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*][b]	*tsst-1*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *cna*, *aur*
C3974	CC30	ST34	t7866[c]	III	E	*scn*, *sak*	PEN, TOB, MUP	*blaZ*, *ant*(4′)-Ia, *mup*(A)	*seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *seu*	*hla*, *hld*, *hlg*, *aur*
C3975	CC30	ST34	t136	III	G	*scn*, *sak*, *sep*	PEN	*blaZ*	*seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *sep*, *seu*	*tsst-1*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *aur*
C3966	CC30	ST34	t136	III	B	*scn*, *chp*, *sak*	PEN	*blaZ*	*seh*, *sei*, *sem*, *seu*	*tsst-1*, *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *aur*
C4239	CC30	ST34	t166	III	B	*scn*, *chp*, *sak*	PEN	*blaZ*	*seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *seu*	*tsst-1*, *hla*, *hld*, *hlg*, *aur*
C3962	CC15	ST15	t084	II	C	*scn*, *chp*	ERY, CLI[a]	*erm*(C)	*sen*	*hla*, *hld*, *hlgv*, *luk-DE*, *aur*
C3964	CC15	ST15	t084	II	C	*scn*, *chp*	–	–	*sen*	*hla*, *hld*, *hlgv*, *luk-DE*, *aur*
C3963	CC9	ST109	t209	II	B	*scn*, *chp*, *sak*	PEN, ERY, CLI[a]	*blaZ*, *mph*(C), *erm*(A), *erm*(C)	[*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*][b]	*hla*, *hlb*, *hld*, *hlgv*, *eta*, *aur*
C3971	CC5	ST5	t002	II	–	–	PEN	*blaZ*	*seb*, *sei*, *sej*, *sem*, *sen*, *seo*	*hla*, *hlb*, *hld*, *hlgv*, *luk-DE*, *aur*
C3967	CC5	ST5	t002	II	F	*scn*, *chp*, *sak*, *sep*	–	–	*sej*, *sen*, *seo*, *sep*	*hla*, *hld*, *hlgv*, *luk-DE*, *aur*

IEC immune evasion cluster, *PEN* penicillin, *ERY* erythromycin, *CLI* clindamycin, *TOB* tobramycin, *MUP* mupirocin, *SEs* staphylococcal enterotoxins

[a] Inducible

[b] *egc*-like cluster

[c] New *spa* type

to the clonal complex CC30, a lineage that seems to have become a successful colonizer of humans [2, 35] and is also considered one of the most frequent *S. aureus* lineages detected in human infections [45]. The detection of a MSSA strain of the sequence type ST398, which is traditionally associated with farm animals (especially pigs), and a MSSA strain belonging to sequence type ST133, related to ungulates and ruminants, suggests the incipient ability of this microorganism to colonize different animal or human hosts away from their usual niches [15, 31]. In addition, as far as we know, *S. aureus* of lineage ST133 has not previously detected in healthy humans. Some authors have hypothesized about the ancestral human origin of genetic line CC133 and the possible evolutionary leap to ruminants many centuries ago [20]. Moreover, recent studies have suggested that the CC398 lineage could be originated in humans as MSSA and then spread to livestock, where it subsequently acquired the *mecA* gene and became well adapted to these animals [36]. It is of interest to indicate that the healthy individual who carried the ST133 isolate worked in a food–animal farm, but the one with ST398 had no relation with farm animals. The two healthy individuals who carried MSSA of the lineages ST398 and ST133 were negative for *S. aureus* nasal carriage (data not shown). We cannot discard the implication of the food chain in the acquisition of these S. *aureus* clones.

The presence of the IEC system, especially of the *scn* gene, could indicate the possible human origin of a *S. aureus* strain, encoding staphylococcal complement inhibitor (SCIN) [39]. SCIN is a staphylococcal inhibitor of human complement

system, in fact, is a C3 convertase inhibitor, blocking the formation of C3b on the surface of the bacterium and the ability of human neutrophils to phagocyte *S. aureus*. In our case, the presence of the genes of IEC system and the absence of *mecA* gene in the detected strain ST398/CC398 indicate that it might belong to the human-associated subclone. By contrast, given that the strain typed as ST133/CC133 does not contain the genes of IEC system and presents capacity to coagulate bovine plasma, it is estimated to belong to the well-adapted ungulates and ruminants lineage. Moreover, the detection of strains of lineage ST5 with and without IEC genes is also of interest. According to some authors, *S. aureus* strains of ST5 lineage could have evolved in time jumping from different hosts and acquiring different adaptability mechanisms [29]. It is interesting to underline the wide variety of IEC types detected among our strains CC30 (A, B, E, and G).

All our *S. aureus* strains were PVL-negative. The *lukF/lukS*-PV genes encoding the Panton–Valentine leukocidin are located in phages, and it is believed that these genes could be transferred from MSSA into CA-MRSA [10]. A high proportion of *S. aureus* strains (40 %) carried the *tsst-1* toxin gene, most of them of the clonal complex CC30. Similar results have been found in other studies of nasal carriers (close to 30 %) [30, 34]. TSST-1 is a toxin related to the toxic shock syndrome. The association between TSST-1 and CC30 has been previously described [10]. One strain (6 %) ascribed to CC9 carried the *eta* gene, encoding the exfoliative toxin A, associated with the staphylococcal scalded skin syndrome and impetigo [33]. Previous studies remark a high association between the clonal complex CC9 and its ability to produce exfoliative toxins [2].

All strains were positive for *hla* and *hld* genes, and high percentage of them were also positive for other hemolysin genes (*hlb*, *hlg*, and *hlgv*). These toxins are produced by a large amount of *S. aureus* strains [11] and have the ability to destroy red blood cells, especially when *S. aureus* reaches the blood and causes bacteremia. One-third of the strains harbored the *lukD-lukE* genes, and only the strain CC133 contained the *lukM* gene encoding a leukocidin, prevalent in isolates of ungulates and ruminants [15, 41].

All MSSA strains except the one of the lineage ST133 carried the *aur* gene encoding the metalloproteinase aureolysin. This fact points again to the animal origin of our strain ST133, due to the capacity of this enzyme to activate prothrombin in human plasma [37, 40]. The absence of the *cna* gene and the tetracycline-susceptible phenotype in strain CC398 might be also a good marker of human origin, given that presence of the *cna* gene and tetracycline resistance are frequently detected in livestock-associated MRSA CC398 strains [32]. Moreover, none of the *S. aureus* strains harbored the biofilm-associated *bap* gene. It has been previously suggested that the prevalence of the gene *bap* in *S. aureus* strains is very low [9, 48].

Only three strains harbored the *egc*-like operon and belonged to ST109/CC9 and ST30/CC30. This cluster is normally found on strains of these clonal complexes [2]. The remaining 12 strains were positive at least for one SE gene; 2 of them belonged to ST34/CC30 and harbored incomplete *egc*-like cluster, lacking the *seo* gene. Incomplete *egc* or *egc*-like clusters have been detected in previous studies [5].

Regarding the antimicrobial resistance pattern of investigated strains, only 60 % showed resistance to penicillin and harbored the *blaZ* gene. Higher rates are normally detected among the nasal *S. aureus* population of healthy individuals [30]. In addition, three strains were erythromycin- and clindamycin-resistant and presented the resistance genes *erm*(A), *erm*(C), *erm*(T) or *mph*(C); these strains belonged to CC9, CC15, and CC398 lineages. The resistance profile of human-associated CC398 lineage frequently includes resistance to macrolides and lincomycins and the presence of *erm*(T) gene [17, 31, 46], similar to our case. One strain belonging to CC30 harbored the *ant*(4′)-Ia and *mupA* genes encoding resistance to tobramycin and mupirocin, respectively. It is important to remark the detection of a mupirocin-resistant strain in the human intestinal microbiota because this antibiotic is the treatment of choice to decolonize the human nasopharynx [30]. The narrow antimicrobial resistant phenotype and genotype found among the studied strains fall within the normal low range typically identified on MSSA strains.

A moderate rate of *S. aureus* fecal carriage has been detected in this study (15 %) with a wide variety of genetic lineages identified. The detection of MSSA strains of the lineages ST398(t571)/CC398 and ST133(t3495)/CC133 is of relevance. Data from our study suggest that strain ST398(t571)/CC398 belongs to the subclone associated with humans, given that it preserves the genes of IEC system, remains negative for the *mecA* gene, and is tetracycline-susceptible. Nevertheless, more studies should be performed in the future to analyze the genetic lineages of big collections of MSSA of healthy humans and animals to deepen the knowledge of the origin and evolution of this microorganism in different niches.

Acknowledgments This work was supported by Project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain. Daniel Benito and Carmen Lozano have a fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and Elena Gómez-Sanz has a fellowship from the Gobierno de La Rioja of Spain.

References

1. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A (2009) Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that nasal carriage and what is its clinical impact? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28:115–127

2. Argudin MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR (2013) Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. Microb Pathog 54:26–33
3. Baker SE, Brecher SM, Robillard E, Strymish J, Lawler E, Gupta K (2010) Extranasal methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus colonization at admission to an acute care Veterans Affairs hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 31:42–46
4. Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K, Zarczynska A, Bystron J, Chrzanowska J, Molenda J (2006) The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. Lett Appl Microbiol 42:315–320
5. Blaiotta G, Fusco V, von Eiff C, Villani F, Becker K (2006) Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. Appl Environ Microbiol 72:6117–6123
6. Comité de l´Antibiogramme de la Societé Française de Microbiologie (CA-SFM): Recommandations 2010 (January 2010 edition) (2010) http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2010.pdf. Accessed 30 July 2012
7. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement (M100-S19). National Committee for Clinical Laboratory Standars, Wayne, PA
8. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty first informational supplement (M100-S21). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA
9. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR (2001) *bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol 183:2888–2896
10. Deurenberg RH, Stobberingh EE (2009) The molecular evolution of hospital and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Mol Med 9:100–115
11. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 13:16–34
12. Dominguez E, Zarazaga M, Torres C (2002) Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from faecal samples of healthy children. J Clin Microbiol 40:2638–2641
13. Donskey JA (2004) The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin Infect Dis 39:219–226
14. European Food Safety Authority (EFSA) (2009) Assessment of the public health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. EFSA J 993:1–73
15. Gharsa H, Ben Sallem R, Ben Slama K, Gómez-Sanz E, Lozano C, Jouini A, Klibi N, Zarazaga M, Boudabous A, Torres C (2012) High diversity of genetic lineages and virulence genes in nasal *Staphylococcus aureus* isolates from donkeys destined to food consumption in Tunisia with predominance of the ruminant associated CC133 lineage. BMC Vet Res 8:203
16. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M (2010) Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. Foodborne Pathog Dis 7:1269–1277
17. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Zarazaga M (2013) High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? Comp Immunol Microbiol Dis 36:83–94
18. Greendyke RM, Constantine HP, Magruder GB, Dean DC, Gardner JH, Morgan HR (1958) Staphylococci on a medical ward, with special reference to fecal carriers. Am J Clin Pathol 30:318–322
19. Grun L (1958) Studies on intestinal staphylococci. Arch Hyg Bakteriol 142:3–7
20. Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, Smyth DS, Lindsay JA, Gould KA, Witney A, Hinds J, Bollback JP, Rambaut A, Penadés JR, Fitzgerald JR (2010) Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. Genome Biol Evol 2:454–466
21. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U (2003) Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. J Clin Microbiol 41:5442–5448
22. Hartman A, Tomasz B (1981) Altered penicillin-binding-proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 19:726–735
23. Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, Jung WK, Kim JM, Park YH (2007) Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. Int J Food Microbiol 117:99–105
24. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G (2011) *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol 166:669–677
25. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F (2002) Relationship between *Staphylococcus aureus* genetic background virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect Immun 70:631–641
26. Jernigan JA, Pullen AL, Flowers L, Bell M, Jarvis WR (2003) Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. Infect Control Hosp Epidemiol 24:409–414
27. Klotz M, Zimmermann S, Opper S, Heeg K, Mutters R (2005) Possible risk for re-colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by fecal transmission. Int J Hyg Environ Health 208:401–405
28. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 29:1128–1132
29. Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL, Weinert LA, Conway-Morris A, Cartwright RA, Simpsons AJ, Rambaut A, Nübel U, Fitzgerald JR (2009) Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA 106:19545–19550
30. Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C (2011) *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. Int J Med Microbiol 301:500–505
31. Lozano C, Aspiroz C, Lasarte JJ, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C (2011) Dynamic of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and ST1 after mupirocin treatment in a family in close contact with pigs. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 34:1–7
32. Lozano C, Rezusta A, Gómez P, Gómez-Sanz E, Báez N, Martin-Saco G, Zarazaga M, Torres C (2012) High prevalence of *spa* types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother 67:330–334
33. Masiuk H, Kopron K, Grumann D, Goerke C, Kolata J, Jursa-Kulesza J, Giedrys-Kalemba S, Bröker BM, Holtfreter S (2010) Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine

leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 48:1527–1535
34. Mégevand C, Gervaix A, Heininger U, Berger C, Aebi C, Vaudaux B, Kind C, Gnehm HP, Hitzler M, Renzi G, Schrenzel J, François P (2010) Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. Clin Microbiol Infect 16:1414–1420
35. Melles DC, Tenover FC, Kuehnert MJ, Witsenboer H, Peeters JK, Verbrugh HA, van Belkum A (2008) Overlapping population structures of nasal isolates of *Staphylococcus aureus* from healthy Dutch and American individuals. J Clin Microbiol 46:235–241
36. Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, Pearson T, Waters AE, Foster JT, Schupp J, Gillece J, Driebe E, Liu CM, Springer B, Zdovc I, Battisti A, Franco A, Zmudzki J, Schwarz S, Butaye P, Jouy E, Pomba C, Porrero MC, Ruimy R, Smith TC, Robinson DA, Weese JS, Arriola CS, Yu F, Laurent F, Keim P, Skov R, Aarestrup FM (2012) *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. Mbio 3:e00305–e00311
37. Prokesová L, Porwit-Bóbr Z, Baran K, Potempa J, Pospísil M, John C (1991) Effect of metalloproteinase from *Staphylococcus aureus* on in vitro stimulation of human lymphocytes. Immunol Lett 27:225–230
38. Rimland D, Roberson B (1986) Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 24:137–138
39. Rooijakkers SH, van Kessel KP, van Strijp AG (2005) Staphylococcal innate immune evasion. Trends Microbiol 13:596–601
40. Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, Kasprowicz A, Sekowska A, van Den Burg B, Travis J, Potempa J (2000) Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. Infect Immun 68:973–976
41. Schlotter K, Ehricht R, Hotzel H, Monecke S, Pfeffer M, Donat K (2012) Leukocidin genes *lukF-P83* and *lukM* are associated with *staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. Vet Res 43:42
42. Schnellmann C, Gerber V, Rossano A, Jaquier V, Panchaud Y, Doherr MG, Thomann A, Straub R, Perreten V (2006) Presence of new *mecA* and *mph*(C) variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. Isolated from the skin of horses before and after clinic admission. J Clin Microbiol 44:4444–4454
43. Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Sais-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN (2003) Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J Clin Microbiol 41:456–459
44. Udo EE, Al-Sweilh N, Noronha BC (2003) A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. J Antimicrob Chemother 51:1283–1286
45. Van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HF, Verbrught HA (2009) Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 9:32–47
46. Vandendriessche S, Kadlec K, Schwarz S, Denis O (2011) Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm(T)* in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother 66:2455–2459
47. Van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA (2006) The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. J Bacteriol 188:1310–1315
48. Vautor E, Abadie G, Pont A, Thiery R (2008) Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal species. Vet Microb 127:407–411
49. Williams REO (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Bacteriol Rev 27:56
50. Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U (2007) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leukocidin gene in Germany in 2005 and 2006. J Antimicrob Chemother 60:1258–1263
51. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. Emerg Infect Dis 13:255–258

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015;xxx(xx):xxx–xxx

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc

Original article

Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case?

Daniel Benito[a], Paula Gómez[a], Carmen Aspiroz[b], Myriam Zarazaga[a], Carmen Lozano[a], Carmen Torres[a,*]

[a] *Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain*
[b] *Unidad de Microbiología. Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 February 2015
Accepted 17 March 2015
Available online xxx

Keywords:
S. aureus
mecC
CC130
CC133
Farmers

ABSTRACT

Objectives: To conduct a study of *Staphylococcus aureus* carriage in members of a livestock-farmer's family with different degrees of animal contact, and to characterize the recovered isolates.
Methods: Nasal samples from 11 members of the family were taken in three sampling periods (every six months) ($n = 31$), and 9 skin samples from superficial lesions were also obtained in 5 of them. Samples were analyzed for *S. aureus* susceptible (MSSA) and resistant to methicillin (MRSA). *S. aureus* isolates were tested for antibiotic-resistance phenotype and genotype and for the detection of virulence and IEC-system genes. Molecular typing of isolates was also performed (*spa*- and multilocus-sequence typing).
Results: Eighteen *S. aureus* isolates were recovered (1 MRSA and 17 MSSA) in the 40 samples analyzed. *S. aureus* was detected in nasal and skin samples of 7/11 and 4/5 of tested humans, respectively. The MRSA strain was detected in the skin lesion of a farmer with high animal contact, and carried the *mecC* gene, and was typed as ST130-CC130-t843. The 17 MSSA isolates were ascribed to 9 different *spa*-types and sequence types included in the clonal complexes CC22, CC30, CC45, CC121, and in the livestock-associated lineages CC9 and CC133. Six strains harbored *eta* or *tsst-1* genes. Three of 18 strains lacked the immune-evasion-cluster (IEC) genes (MRSA-ST130, MSSA-ST1333, and MSSA-ST133), and the remaining isolates were ascribed to IEC type-A or -B.
Conclusions: Animal-associated *S. aureus* lineages were detected in samples of the farmer's family, highlighting the detection of MSSA-CC133 and *mecC*-MRSA-ST130.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* en personas relacionadas con una granja de ganado en España, con la detección de SARM-CC130-*mecC*: ¿un caso de zoonosis?

Palabras clave:
S. aureus
mecC
CC130
CC133
Granjeros

RESUMEN

Objetivo: Estudiar la presencia de *S. aureus* en muestras nasales y cutáneas de los miembros de una familia de granjeros, con distinto nivel de contacto con ganado, y caracterizar los aislados obtenidos.
Métodos: Se recogieron 3 muestras nasales (1 cada 6 meses) de los 11 miembros de la familia de granjeros ($n = 31$) y 9 muestras cutáneas de pequeñas lesiones de 5 de ellos, para aislamiento de *S. aureus*, tanto sensible (SASM) como resistente a meticilina (SARM). Se realizó la caracterización molecular de los aislados (*spa*- y multi-locus-sequence-typing) y se estudiaron sus fenotipos y genotipos de resistencia, y su contenido en genes de virulencia y del clúster de evasión-inmune-humano (IEC).

* Corresponding author.
E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).

http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008
0213-005X/© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Benito D, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008

Resultados: Se obtuvieron 18 aislados de *S. aureus* (1 SARM y 17 SASM) en las 40 muestras estudiadas. De las personas examinadas, 9/11 fueron portadoras de *S. aureus*: 7/11 en muestras nasales y 4/5 en cutáneas. La cepa SARM fue aislada en una lesión cutánea de un granjero, portaba el gen *mecC* y se tipó como ST130-CC130-t843. En las 17 cepas SASM se detectaron 9 tipos de *spa* y 9 secuencias-tipo, adscritas a los complejos clonales CC2, CC30, CC45, CC121 y a los asociados con ganado CC9 y CC133. Seis cepas portaron los genes *eta* o *tsst-1*. Tres de las 18 cepas carecían de los genes del sistema de evasión inmune (IEC) (SARM-ST130, SASM-ST1333 y SASM-ST133), y el resto presentaron IEC-A o -B.
Conclusión: Se detectaron líneas genéticas de *S. aureus* asociadas a animales en la familia de granjeros, destacando la detección de SASM-CC133 y SARM-ST130-*mecC*.
© 2015 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Introduction

Staphylococcus aureus is a microorganism that can be found in the natural microbiota of humans and animals, mainly colonizing skin and nasopharynx.[1] It has been considered as one of the most common opportunistic pathogens, able to cause infections of varying severity.[2,3] In some situations, these infections are caused by *S. aureus* with methicillin-resistance determinants as *mecA* gene, which confers resistance to most β-lactams. Thus, some genetic lineages, as the clonal complexes CC5, CC22, CC30 or CC45, have been associated with hospital environments (HA-MRSA) with high capacity to cause nosocomial infections and to carry a large set of antibiotic-resistance genes.[4] On the other hand, genetic lineages as CC8 or CC80 and CC30, among others, have been related to community environments (CA-MRSA), known for its high content of virulence factors but low levels of resistance.[5] However, the differences between HA-MRSA and CA-MRSA isolates have become diffuse, and clonal lineages considered community associated are being related to hospital environments and vice versa.

Moreover, in the last years, other genetic lineages belonging to CC398, CC1, CC9, CC130 or CC133, known as livestock-associated MRSA (LA-MRSA), have emerged as an important zoonotic problem.[6,7] They have been increasingly detected in animals or humans, either as colonizer or causing infections.[6,8] In 2011, a new *mecA* homologue was described in the *S. aureus* isolate LGA251 from an epidemiological study of bovine mastitis in England.[10] This new resistance determinant shared homology of 70% over the *mecA* and was named as $mecA_{LGA251}$,[9] and renamed in 2012 as *mecC*[10] and was integrated into the new chromosomal cassette SCC*mec*-XI.[11]

There is special interest to know the genetic lineages of *S. aureus* that are circulating in livestock environments in order to track its evolution, particularly those genetic lineages with high zoonotic potential, as CC398, CC130 or CC133. For this aim, the use of molecular techniques, such as *spa*-, *agr*-, or MLST typing, is very useful. A recent important tool for discriminating possible human or animal origin of isolates seems to be the determination of the human immune evasion cluster (IEC). The IEC constitutes a set of genes that enhances colonization by *S. aureus* allowing evasion of the first barriers of the human immune defenses, and increasing their invasive abilities.[2,12]

The objective of the present study was to perform a longitudinal study of *S. aureus* carriage in 11-member family of livestock farmers with different animal contact degree. The purpose was to carry out the molecular characterization of the recovered *S. aureus* isolates to determine the genetic lineages circulating and to study their resistance and virulence genes content as well as their IEC system.

Material and methods

Sampling, bacterial isolation and molecular typing of isolates

A total of 11 human volunteers of a family related to a livestock farm and with different animal contact degree were included in this study: H, high contact: three farmers which worked continuously in the livestock farm; I, intermediate contact: three individuals which lived in a house in the livestock farm and worked sporadically on it; L, low contact: the remaining five individuals which cohabited with these six continuous and sporadic workers of the livestock farm. This farm was located in La Rioja region, Northern Spain, and had different types of food-animals (mainly veal calves, but also sheep, goats or horses), in addition to pet animals (dogs and cats).

Nasal samples of these 11 individuals were taken in three periods every six months (1: April 2013; 2: October 2013; 3: April 2014), and a total of 31 nasal samples were obtained (in two of the individuals only two nasal samples could be recovered). Moreover, five of the individuals presented minor skin lesions (infected eczemas or small superficial wounds) and nine samples of these origins were obtained. Individuals (age range: 26–61; 45% men and 55% women) had neither received antibiotics nor had relation with the hospital environment during the study, except for one individual who had a long-term injury in the foot, exacerbated by diabetes (case 4; Table 1). Informed consent was obtained from all individuals included in this study with adherence to ethical standards.

Nasal and skin-lesion swabs were directly inoculated in Brain–Heart-Infusion (BHI, Becton–Dickinson) broth containing 6.5% NaCl and incubated at 37 °C for 24 h. Then, 100 μL of this culture was seeded on Mannitol Salt Agar (MSA, Becton–Dickinson) and Oxacillin-Resistance-Screening-Agar-Base (ORSAB, OXOID) supplemented with 2 mg/L of oxacillin, and the plates were incubated at 37 °C for 24–36 h. Presumptive *S. aureus* and MRSA colonies were selected in MSA and ORSAB plates, respectively. Two *S. aureus* isolates per positive plate were initially selected, but only isolates with different antimicrobial-resistance phenotype or different *spa* type per sample were further characterized. Identification of *S. aureus* and MRSA was performed by conventional methods (DNAse assay, catalase and Gram staining) and confirmed by specific PCRs of the *nuc* (*S. aureus* specific thermonuclease) and *mecA* or *mecC* genes.[13,14] *S. aureus* isolates were typed by: *spa* (www.ridom.com), *agr*, and multilocus sequence typing (MLST) (saureus.mlst.net).[11] *spa*- and *agr*-typing were performed for all *S. aureus* isolates. MLST was only performed in one isolate per each different *spa* type and SCC*mec* typing was carried out in methicillin resistant strains. All isolates were ascribed to a specific clonal complex (CC) (saureus.mlst.net/eburst).

Please cite this article in press as: Benito D, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008

Table 1
Characteristics of the 11 tested individuals and periods of sampling.

Individual	Age	Sex[a]	Animal contact[b]	Periods of nasal sampling ($n = 31$)[c]	Periods of skin lesion sampling ($n = 9$)[c]
1	29	M	H	**1** 2 3	2 **3**
2	34	M	H	**1 2 3**	
3	37	M	H	**1** 2 3	**2**[d] 3
4	49	F	I	1 2 3	**1 2 3**
5	26	F	I	**1 2** 3	
6	44	M	I	1 2 3	**1**
7	57	M	L	**1 2** 3	
8	55	F	L	**1** 2 3	
9	61	F	L	**1** 2 3	3
10	29	F	L	1 2	
11	50	F	L	1 3	

[a] Sex: M, male; F, female.
[b] Animal contact degree: H, high contact, continuous farm workers; I, intermediate contact, individuals living on the farm and occasional farm workers; L, low contact, individuals cohabiting with farm workers or with those living on the farm.
[c] Periods with *S. aureus* detection are underlined.
[d] Two different strains recovered in this period were further characterized.

Susceptibility testing and detection of resistance genes

The resistance phenotype to 16 antibiotics (penicillin, oxacillin, cefoxitin, tetracycline, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, streptomycin, kanamycin, linezolid, mupirocin, fusidic acid, cloramphenicol and trimethoprim-sulfamethoxazole) was determined by the disk-diffusion method.[15,16] In addition, the presence of 26 antibiotic-resistance genes [including *blaZ, blaZ*-SCC*mec*-XI, *mecA, mecC, tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(T), *lnu*(A), *lnu*(B), *ant*(4′)-*Ia*, *aph*(3′)-*IIIa*, *aac*(6′)-*aph*(2″), *aad*(A), *aad*(E), *str*, *fus*(*B*), *fus*(*C*), and *mup*(*A*)] was analyzed by PCR.[6,14]

Detection of virulence genes and immune-evasion-cluster (IEC) genes

The virulence profile analysis was performed by PCR for detection of the following genetic determinants: *lukF/lukS*-PV (Panton-Valentine leukocidin), *tsst-1* (toxic shock syndrome toxin), *eta, etb, etd*, and *etd2* (exfoliative toxin A, B, D and D2 respectively). In addition, the genes encoding leukocidines DE (*luk-DE*) and M (*lukM*), the biofilm-associated protein (*bap*), and the collagen-binding protein (*cna*) were also studied by PCR.[6]

The five genes that comprise the IEC cluster (*scn*, *chp, sak*, and *sea* or *sep*) were studied by PCR. Depending on the presence or absence of these genes and their different combinations, *S. aureus* isolates were classified into 7 different IEC types according to patterns previously described.[12] The *scn* gene is mandatory for the consideration of the IEC types.

Results

Prevalence of S. aureus detected in this study

Table 1 shows the characteristics of the 11 members of the family studied, as well as the samples and periods analyzed. *S. aureus* was detected (either in nasal or skin samples) in 9 of the 11 individuals tested, 6 of them worked continuously or lived in the farm and the other three cohabited with them. *S. aureus* was detected in nasal and skin samples of 7/11 and 4/5 tested humans, respectively.

S. aureus isolates were found in 17 of the 40 samples analyzed (42.5%) that corresponded to 35.5% of nasal samples (11/31) and 66.6% of the skin samples (6/9). In one skin sample (case 3), two isolates with different resistance phenotype were identified and both were characterized. Table 2 shows the molecular characteristics of 18 studied isolates. 11 of them were of nasal origin and 7 from superficial skin lesions. Most of these isolates (17 of 18) were MSSA, but one MRSA isolate was also detected.

In relation to nasal carriage, 63.6% of individuals were *S. aureus* carriers. It is important to remark that all individuals that worked on the farm or that lived in the house in the farm (included in H or I groups depending on animal contact degree) were *S. aureus* carriers, either in the nose or in the skin. One of the farmers (case 2) carried the same clone of *S. aureus* along the three periods studied and was typed as t209/ST109/CC9.

Characteristics of the MRSA strain from the farmer carrier

The MRSA strain was recovered in the superficial skin lesion of one farm worker with high contact with animals. This strain was ascribed to *spa*-type-t843, *agr*-type-III, sequence-type ST130, clonal complex CC130 and SCC*mec*-XI. The strain showed susceptibility to all non-β-lactam antimicrobials and carried the *mecC* and *blaZ*-SCC*mec*-XI resistance genes, in addition to the virulence genes *luk-DE* and *etd2*. This strain lacked the genes of the IEC system.

Three nasal samples and two skin-lesion samples were obtained in the farmer who carried the *mecC*-MRSA strain. This *mecC* strain was recovered in one of the two skin samples analyzed, that corresponded to the third sampling period (during that period, the farmer was working in the field of traditional cheese production in a very close dairy cattle farm, besides working in the farm of this study). An additional *S. aureus* strain was also obtained in one of the three nasal samples of this farmer, but corresponded to a MSSA CC30 strain (Table 2).

Characteristics of the MSSA isolates

A high diversity of *spa*-types ($n = 9$) was detected among the 17 MSSA isolates (t012, t015, t166, t209, t352, t790, t11719, t2155, t2678). Moreover, 9 different sequence types (ST22, ST30, ST34, ST45, ST109, ST121, ST133, ST1333, ST1842) belonging to 6 different clonal complexes (CC9, CC22, CC30, CC45, CC121, CC133) were identified in our study, being the most predominant STs/CCs being the following ones (% of strains): ST30 or ST34 or ST1333 or ST1842/CC30 (35.3%), ST45/CC45 (23.5%), and ST109/CC9 (17.6%). It is remarkable the detection of one *S. aureus* strain belonging to a lineage that has been associated with animals, as is the case of t2678/ST133/CC133. Interestingly, this strain was recovered from an individual who lived in the farm and worked sporadically on it. The most frequent *agr*-type detected was *agr*-I (7 strains) followed by *agr*-II (6 strains), *agr*-III (4 strains) and *agr*-IV (1 strain).

Antimicrobial susceptibility testing of MSSA strains showed the following results [% of strains/genes detected]: penicillin

Please cite this article in press as: Benito D, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008

Table 2
Characteristics of the 18 *S. aureus* strains recovered in this study from nasal or skin lesion samples of 9 of the 11 tested individuals.

Case	Animal contact[a]	Origin[b]	Period[c]	N° Strains	Molecular Typing				Antimicrobial Resistance		Virulence Factors	
					spa-type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC[d]	Phenotype[e]	Genotype	IEC type[f]	Other genes
1	H	NS	1	1	t166	III	–	ST34/CC30	PEN, KAN, STR	*blaZ, aph(3′)-III, str*	B	*eta*
		SS	3	1	t843	III	XI	ST130/CC130	PEN, OXA, FOX	*mecC, blaZv*-SCC*mec* XI	-	*luk-DE, etd2*
2	H	NS	1/2/3	1/1/1	t209	II	–	ST109/CC9	PEN, ERY, CLI	*blaZ, erm(A), erm(C)*	B	*eta, luk-DE*
3	H	NS	1	1	t012	II	–	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*eta, luk-DE*
		SS	2	1	t012	II	–	ST30/CC30	PEN	*blaZ*	A	*eta, luk-DE*
		SS	2	1	t11719	II	–	ST1333/CC30	PEN, ERY, CLI, TET, FUS, MUP	*blaZ, msr(A), msr(B), mph(C), erm(A), erm(C), tet(K), fus(C), mup(A)*	-	*cna*
4	I	SS	1	1	t2678	I	–	ST133/CC133	PEN, KAN	*blaZ, aph(3′)-III*	-	*tsst-1, luk-DE, luk-M*
		SS	2	1	t352	III	–	ST1842/CC30	PEN, MUP	*blaZ, mup(A)*	A	*tsst-1*
		SS	3	1	t352	III	–	ST1842/CC30	PEN, MUP	*blaZ, mup(A)*	A	*tsst-1*
5	I	NS	1/2	1/1	t790	I	–	ST22/CC22	PEN	*blaZ*	B	*cna*
6	I	SS	1	1	t2155	IV	–	ST121/CC121	PEN	*blaZ*	B	*cna*
7	L	NS	1/2	1/1	t015	I	–	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*cna*
8	L	NS	1	1	t015	I	–	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*cna*
9	L	NS	1	1	t015	I	–	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*cna*

[a] Animal contact degree: H, high contact, continuous farm workers; I, intermediate contact, individuals living on the farm and occasional farm workers; L, low contact, individuals cohabiting with farm workers or with those living on the farm.
[b] NS: nasal sample; SS: skin samples of small skin lesions.
[c] Periods of sampling: (1) time zero, April 2013; (2) at 6 months October 2013; (3) at 12 months, April 2014.
[d] MLST was performed in one strain of each *spa* type.
[e] Antimicrobials: PEN, penicillin; OXA, oxacillin; FOX, cefoxitin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; FUS, fusidic acid; TET, tetracycline; MUP, mupirocin.
[f] IEC: Immune Evasion Cluster. IEC type-A (*scn, chp, sak, sea*); IEC type-B (*scn, chp, sak*).

[100%/*blaZ*]; erythromycin [23.5%/*msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *erm*(A), *erm*(C)] and clindamycin [23.5%]; kanamycin [11.8%/*aph(3′)-IIIa*], tetracycline [5.9%/*tet*(K)], mupirocin [17.7%/*mup*(A)], streptomycin [5.9%,*str*] and fusidic acid [5.9%)/*fus*(C)]. All detailed results are shown in Table 2.

A high diversity of virulence factors was identified among the 17 MSSA strains (Table 2). Interestingly the 3 strains recovered from skin lesions of the same individual and typed as CC133 or CC30 contained the *tsst-1* toxin gene, and 6 strains (isolated from three different individuals, case 1, 2 and 3) belonging to lineages CC9 or CC30 harbored the exfoliative toxin A gene (*eta*). The *luk-DE* genes were detected in 7 strains and the *lukM* gene was identified in the strain t2678/ST133/CC133. Eight strains of lineages CC22, CC30 and CC45 were positive for *cna* gene. All strains were negative for the presence of the genes *lukF/lukS*-PV, *etb*, *etd* and *bap*.

All MSSA strains harbored the genes of the IEC system except for two strains ascribed to ST133/CC133 and ST1333/CC30. The IEC type-B was predominant among the remaining strains (11 isolates), followed by IEC type-A (4 isolates).

Discussion

The detection of a *mecC* positive MRSA strain from a skin lesion of one of the workers of the livestock farm is of great relevance, and the animal origin of this strain is highly suggested. The lack of the IEC cluster in this strain is of relevance, as it supports its potential animal origin. MRSA strains of the lineage CC130 have been detected in other studies in farm animals,[17] mainly in cows and also in cow's milk.[7] It is interesting to note that this farmer was working in the traditional production of cow cheese in a dairy farm close to the farm under study, where most animals were cattle. It is possible that the contact with the animals or with the milk could be in the origin of this strain. The characteristic profile of susceptibility for non-beta-lactams and the restricted virulence gene content to *etd2* of our CC130 strain, agree with results of other *mec*C MRSA strains previously reported.[18]

The *mecC*-MRSA strain detected in our study was typed as t843-ST130-CC130, and it is one of the first cases described in farmers in Spain and the first one relating with cheese traditional making, with the potential risk that could entail its entry into the food chain. Some previous studies performed in Spain found the lineage t843/ST130 as the causative agent of fatal bacteremia in hospitalized patients or in a community patient.[18–20] Other authors have identified similar genetic lineages (t1535/ST130) harboring *mecC* gene in wild small mammals[14] or t843/ST2676 in urban wastewater,[21] evidencing the spread of this lineage in different environments in Spain. Moreover, a case has recently been detected of *S. aureus* carrying *mecC* in livestock in Spain[22] and in river water close to a livestock farm.[23] Regarding the situation in other countries, MRSA strains typed as t843/ST130 have been described previously in humans in the European Union,[10] but this lineage was also detected in different animal host species as cattle, cows, sheep or pets in UK, Denmark, Germany or France.[10] Some authors suggested that MRSA *mecC* emerged in animals, mainly in ruminants, and subsequently made the leap to humans.[9] In our case, the strain belonging to CC130 lacked the genes of the IEC system, and this fact points to an animal origin, probably being a potential case of zoonosis of LA-MRSA from cattle to human. In the same line, there are a few European studies with the objective of testing the possible zoonotic transmission between cattle and humans.[24–26] In all of these studies, humans with different infections presented livestock animal contact or were linked to a farming activity. This fact supports the possible zoonotic transmission in our study.

Please cite this article in press as: Benito D, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008

Seven of the *spa* types identified in this study were ascribed to CC30, a lineage frequently found as colonizer of human microbiota,[13,27] and it is also considered one of the most frequent *S. aureus* lineages detected in human infections.[3] Strains of skin origin of lineage CC30, recovered from the individual of case 4, harbored the *tsst-1* gene encoding the toxic shock syndrome toxin (TSST). It is interesting to remark that this person lived in the farm and often showed superficial and difficult healing wounds. The presence of relevant virulence factors (typical of community-associated *S. aureus*) and the low content in resistance determinants have been previously reported by other authors in MRSA-CC30 strains.[28] Interestingly one MSSA strain typed as t11719-ST1333-CC30 showed a multidrug-resistance phenotype (penicillin-erythromycin-clindamycin-tetracycline-fusidic acid-mupirocin) with the detection of several resistance determinants (Table 2). This genetic lineage has been previously reported in canine samples from Japan[29] and the absence of the genes of IEC system points to a possible animal origin of the strain.[13]

In the same line, detection of one MSSA strain typed as t2678-ST133-CC133 is remarkable because in previous studies it has been detected in small ruminants such as goats or sheep.[30] The detection of gene *lukM*, prevalent in ungulates, ruminants and bovine mastitis,[7] and the absence of IEC genes, supports the idea of the possible animal origin of the strain. Interestingly, some authors have suggested a possible ancestral human origin of the genetic lineage CC133 and have hypothesized about the possibility of jumping to ruminants few centuries ago.[31]

MSSA strains detected in five members of the family (belonging to animal-contact degree groups I and L) were assigned to hospital-associated clonal complexes CC22, CC45 and CC121.[4] Therefore, some authors have postulated about the ability of MSSA to serve as recipient of the SCC*mec* cassette, subsequently losing any of its components, as the *mecA* gene.[27] Moreover, the lineage t2155-ST121-CC121 found in one of our MSSA strains, has also been detected among MRSA implicated in skin and soft tissues infections.[32] Interestingly, this strain was isolated from a skin lesion of an individual who worked sporadically in the farm (Case 6). In the same line, many studies have associated the MRSA-ST22 genetic lineage with frequent infections in Europe. This lineage in its methicillin-resistance form was called EMRSA-15.[33] In our case methicillin-susceptible CC22 clade was detected.

As for the single case (case 2) where colonization was maintained by the same CC9 clone of *S. aureus* over the period studied, it is interesting to note that this genetic lineage was initially associated with farm animals, mainly pigs in Asia.[34] Similarly CC9 has been detected in meat samples in Spain[35] and in bloodstream infections in France,[36] with similar patterns of resistance, particularly resistance to erythromycin, but the difference is of methicillin resistance in our case. This MSSA profile and the presence of IEC type-B, points to the possible human origin of this clone and reveals its great capacity for colonization in different environments. Furthermore, the presence of the gene encoding the exfoliatin A (*eta*) on the CC9 strains of this individual is noteworthy. Previous studies have suggested a high association between the CC9 and its ability to produce exfoliative toxins.[27]

Conclusions

We report the detection of the lineage ST130/CC130 containing the novel methicillin-resistance-determinant *mecC* as well as other livestock-associated *S. aureus* lineages (as CC133 or CC9) in nasal or skin samples of a family of livestock farmers in Spain. The *mecC*-CC130 strain was isolated from the superficial skin lesion of a farmer which had daily contact with farm animals, mainly cattle, and with traditional cheese production. Cows have been postulated as the main reservoir of this emerging genetic lineage. This fact highlights the zoonotic potential of this emergent resistant microorganism and other similar animal-related clades, with the risk that this entails for human health. More studies should be performed in the future to assess the real risk for colonization and infection of farmers in relation to MRSA-*mecC* clones and the different reservoirs that may exist in nature.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This project was supported by project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Daniel Benito has a predoctoral fellowship from the Ministerio de Economia y Competitividad of Spain (reference BES-2010-039341) and Paula Gómez has a predoctoral fellowship of the University of La Rioja, Spain (reference). Carmen Lozano has a contract associated with project SAF2012-35474.

References

1. Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. Int J Med Microbiol. 2011;301:500–5.
2. Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. Vet Dermatol. 2009;20(5-6):456–70.
3. Van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, et al. Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2009;9:32–47.
4. Chua KY, Howden BP, Jiang JH, Stinear T, Peleg AY. Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2014;21:554–62.
5. Vindel A, Trincado P, Cuevas O, Ballesteros C, Bouza E, Cercenado E. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004-12. J Antimicrob Chemother. 2014;69:2913–9.
6. Benito D, Lozano C, Rezusta A, Ferrer I, Vasquez MA, Ceballos S, et al. Characterization of tetracycline and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital: Is livestock-contact a risk factor in infections caused by MRSA CC398. Int J Med Microb. 2014;304:1226–32.
7. Schlotter K, Ehricht R, Hotzel H, Monecke S, Pfeffer M, Donat K. Leukocidin genes lukF-P83 and lukM are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. Vet Res. 2012;43:42.
8. Pantosi A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. Front Microbiol. 2012;3:127.
9. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11:595–603.
10. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 2014;22:42–7.
11. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, et al. Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3765–73.
12. Van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. J Bacteriol. 2006;188:1310–5.
13. Benito D, Lozano C, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. Microb Ecol. 2013;66:105–11.
14. Gómez P, González-Barrio D, Benito D, García JT, Viñuela J, Zarazaga M, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. J Antimicrob Chemother. 2014;69:2061–4.
15. Clinical Laboratory Standards Institut. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty two informational supplement M100-S24. CLSI. PA, USA: Wayne; 2014.
16. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0; 2014. http://www.eucast.org

Please cite this article in press as: Benito D, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008

17. Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The mec alphabet with specific consideration of *mecC*, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. Int J Med Microbiol. 2014;304:794–804.
18. García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. J Antimicrob Chemother. 2014;69:45–50.
19. Romero-Gómez MP, Mora-Rillo M, Lázaro-Perona F, Gómez-Gil MR, Mingorance J. Bacteremia due to meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in a patient with urothelial carcinoma. J Med Microbiol. 2013;62:1914–6.
20. Cano Garcia ME, Monteagudo Cimiano I, Mellado Encinas P, Ortega Álvarez C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the mecC gene in a patient with a wound infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.06.011.
21. Porrero MC, Valverde A, Fernández-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, Lavín S, et al. *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. Emerg Infect Dis. 2014;20:899–901.
22. Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Methicillin-Resistant Rodríguez-Lázaro D. *Staphylococcus aureus* Harboring *mecC* in Livestock in Spain. J Clin Microbiol. 2014;52:4067–9.
23. Porrero MC, Harrison EM, Fernández-Garayzábal JF, Paterson GK, Díez-Guerrier A, Holmes MA, et al. Detection of mecC-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. Environ Microb Rep. 2014, http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12191.
24. Barraud O, Laurent F, François B, Bes M, Vignon P, Ploy MC. Severe human bone infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* variant. J Antimicrob Chemother. 2013;68:2949–50.
25. Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. Clin Microbiol Infect. 2013;19:E16–22.
26. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. EMBO Mol Med. 2013;5:509–15.
27. Argudín MA, Argumosa V, Mendoza MC, Guerra B, Rodicio MR. Population structure and exotoxin gene content of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Spanish healthy carriers. Microb Pathog. 2013;54:26–33.
28. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7:629–41.
29. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Ohtsuka M, Hongo I, Fukata T, et al. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. J Clin Microbiol. 2012;50:2152–5.
30. Porrero MC, Hasman H, Vela AI, Fernández-Garayzábal JF, Domínguez L, Aarestrup FM. Clonal diversity of *Staphylococcus aureus* originating from the small ruminants goats and sheep. Vet Microbiol. 2012;156(1-2):157–61.
31. Guinane CM, Ben Zakour NL, Tormo-Mas MA, Weinert LA, Lowder BV, Cartwright RA, et al. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. Genome Biol Evol. 2010;2:454–66.
32. Conceição T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, et al. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30:293–7.
33. Faria NA, Miragaia M, de Lencastre H. Massive dissemination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in bloodstream infections in a high MRSA prevalence country: establishment and diversification of EMRSA-15. Microb Drug Resist. 2013;19:483–90.
34. Cui S, Li J, Hu C, Jin S, Li F, Guo Y, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. J AnSutimicrob Chemother. 2009;64:680–3.
35. Benito D, Gómez P, Lozano C, Estepa V, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, et al. Genetic lineages, antimicrobial resistance, and virulence in *Staphylococcus aureus* of meat samples in Spain: analysis of immune evasion cluster (IEC) genes. Foodborne Pathog Dis. 2014;11:354–6.
36. Lamamy C1, Berthelot A, Bertrand X, Valentin AS, Dos Santos S, Thiais S, et al. CC9 livestock-associated *Staphylococcus aureus* emerges in bloodstream infections in French patients unconnected with animal farming. Clin Infect Dis. 2013;56:e83–6.

Please cite this article in press as: Benito D, et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008

FEMS Microbiology Ecology, 91, 2015, fiv007

doi: 10.1093/femsec/fiv007
Advance Access Publication Date: 12 January 2015
Research Article

RESEARCH ARTICLE

Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from faeces of healthy neonates and potential mother-to-infant microbial transmission through breastfeeding

Daniel Benito[1], Carmen Lozano[1], Esther Jiménez[2], Mar Albújar[3], Adolfo Gómez[3], Juan M. Rodríguez[2,4] and Carmen Torres[1,*]

[1]Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain, [2]ProbiSearch, S.L., Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain, [3]Servei de Pediatria, Hospital Joan XXIII, 43007 Tarragona, Spain and [4]Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Carmen Torres PhD, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain. Tel: +34-941-299750; Fax: +34-941-299721; E-mail: carmen.torres@unirioja.es

One sentence summary: Report of high frequency of *Staphylococcus aureus* faecal carriage in healthy neonates and potential contribution of breastfeeding in this bacterial acquisition, as demonstrated in four cases of mother–infant in this study.

Editor: Julian R. Marchesi

ABSTRACT

Twenty-one women and their respective singleton infants participated in this study, contributing with samples of breast milk and faeces (at days 7, 14 and 35 after birth), respectively, used for *Staphylococcus aureus* recovery. The aim was to track the carriage of *S. aureus* in milk and infant faeces of mother–infant pairs, and to determine the genetic lineages of the isolates, their potential clonal relationships and their content in antimicrobial resistance, virulence and immune evasion cluster genes. The molecular characterization was performed by PCR and sequencing. Clonal relationship among mother–infant isolates was conducted by *spa* typing, multilocus sequence typing (MLST), and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Staphylococcus aureus* was isolated from milk samples of 6 of 21 mothers (16 isolates) and from faecal samples of 12 of 21 infants (25 isolates). From these 41 *S. aureus* recovered, 18 were methicillin-resistant (MRSA) and 23 methicillin-susceptible (MSSA). Twelve diferentes *spa* types and eight sequence types were detected among *S. aureus*. Predominant clonal complexes were CC5 (43.9%) and CC30 (36.6%). MRSA strains presented a multidrug-resistance profile, 65.2% of MSSA strains harboured *tsst-1* toxin gene and 26.8% of total strains carried the *cna* gene. A potential mother-to-infant *S. aureus* transmission was demonstrated in four cases by *spa* typing, MLST and PFGE (transmission of t322/ST5/CC5-PFGE-A, t136/ST34/CC30-PFGE-B and t021/ST1869/CC30-PFGE-C strains). Breastfeeding seems to contribute to early *S. aureus* intestinal colonization in neonates what might affect the immune system development.

Key words: methicillin-resistant; neonate faecal carriage; breastfeeding *Staphylococcus aureus* transmission;

Received: 1 October 2014; **Accepted:** 5 January 2015
© FEMS 2015. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

INTRODUCTION

Early life seems to be a crucial period for the correct establishment of the gut microbiota, with short-, medium- and long-term consequences for the host health (Sim *et al.*, 2013). During such life stage, vertical mother-to-infant microbial transmission usually plays a pivotal role in initial colonization of the neonatal gut (Cho and Blaser 2012). Although there are many studies on the potential transmission of those bacteria most frequently involved in neonatal sepsis (e.g. *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*), data on other bacteria that can be epidemiologically relevant in the community, such as *Staphylococcus aureus*, are scarce (Bourgeois-Nicolaos *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2011; Jimenez-Truque *et al.*, 2012; Leshem *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus is a species commonly found as part of the normal human microbiota, mainly in the oropharynx, nose and skin, although it can also be found as part of the gut microbiota (Dominguez, Zarazaga and Torres 2002; Benito *et al.*, 2013) of both healthy and hospitalized hosts. *Staphylococcus aureus* is an extremely versatile opportunistic pathogen with a multitude of mechanisms able to cause disease and circumvent immune defences. Therefore, colonization of term neonates with this species might increase the risk of infection during early life (van Belkum *et al.*, 2009). Nevertheless, other studies report that perinatal colonization with *S. aureus* may have a positive effect in the development of the immune system of neonates (Lundell *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus can harbour or acquire different resistance determinants and, among them, the acquisition of the *mec*A gene is particularly relevant since it confers resistance to methicillin and to most beta-lactams. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) can affect both hospitalized (HA-MRSA) and community (CA-MRSA) patients. On the other hand, *S. aureus* can produce a large variety of virulence factors that can exacerbate the clinical outcome of staphylococcal infections (Jarraud *et al.*, 2002). Some of the most important virulence factors are Panton-Valentine leukocidin (PVL), toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), different haemolysins, exfoliatins, enterotoxins and other virulence factors, which facilitate cellular invasion, bacterial growth and immune evasion (Sabat *et al.*, 2000; Cucarella *et al.*, 2001; Jarraud *et al.*, 2002; van Wamel *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 2007).

Recently, there has been a special interest to know the genetic lineages of *S. aureus* isolates that are circulating in different environments in order to track their evolution in different niches, and to know the potential original sources. In this sense, the immune evasion cluster (IEC) could be an important marker allowing *S. aureus* to avoid the action of some components of the human innate immune system. The isolates adapted to animal hosts frequently lack the IEC system genes (Benito *et al.*, 2013).

In a previous study of our group, the cultivable bacterial diversity of milk and faeces from 16 lactating mothers and their breast-fed infants, respectively, was assessed (Jiménez *et al.*, 2008). The recovered *S. epidermidis* and enterococci isolates were fully characterized (Jiménez *et al.*, 2008). In addition, *S. aureus* isolates could be recovered from some of these mother–infant pairs but they were not characterized. The objective of this study was, first, to track the carriage of *S. aureus* in the milk and infant faeces samples provided by 21 mother–infant pairs (incluing 16 from the previous study and 5 additional ones recruited in this study), and, later, to determine the genetic lineages of the isolates, the potential clonal relationships among those isolates obtained within a same mother–infant pair and their content in antimicrobial resistance genes, as well as in virulence and IEC genes.

METHODS

Collection of samples

A total of 21 women and their respective singleton infants participated in the study and they fulfilled the following characteristics: (a) healthy women with a normal full-term pregnancy; (b) vaginal delivery; (c) absence of infant and/or maternal perinatal problems, including mastitis, and no intrapartum antibiotic use; and (d) infants exclusively breastfeeded. All volunteers gave written informed consent to the protocol, which was approved by the Ethical Committees of Hospital Joan XXIII (Tarragona, Spain) and Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). Women and their respective infants provided a sample of breast milk and faeces, respectively, at days 7, 14 and 35 after birth. Milk samples were collected aseptically in a sterile tube by manual expression using sterile gloves. Previously, nipples and mammary areola had been cleaned with soap and sterile water and soaked in chlorhexidine (Cristalmina, Salvat, Barcelona, Spain). The first drops (~500 μL) were discarded. The faecal samples (~5 g) were collected in individual sterile faeces containers. All the samples were kept at 4°C until delivery to the laboratory (maximum of 12 h) and immediately processed.

Sampling procedures of *S. aureus* isolates

Dilutions of the samples were plated onto two selective media: Baird–Parker agar and Columbia–Nalidixic Acid agar (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Between 5–10 representative isolates, whose colony morphology and other phenotypic characteristics (cell shape, Gram staining, catalase and oxidase activities) were compatible with those of staphylococci (including, at least, one representative of each colony morphology), were selected from each culture medium, grown in BHI broth and stored at −80°C in the presence of glycerol (30%, v/v). All the isolates were identified to the species level by a multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes (Jiménez *et al.*, 2008) and the identification was later confirmed by MALDI-TOF (VITEK MS, BioMerieux). Subsequently, all the isolates that were identified as *S. aureus*, either from milk or faecal samples, were included in this study. The presence of the *nuc* gene was also studied for further confirmation of *S. aureus* isolates (Lozano *et al.*, 2011).

Molecular typing of isolates

Molecular characterization of the *S. aureus* isolates was performed by different molecular methods. *Spa* typing was carried out (Harmsen *et al.*, 2003), and obtained sequences were analysed using the Ridom Staph Type software version 1.5.21 (Ridom GmbH). Determination of *agr* allotypes—accessory gene regulatory loci—was performed by two multiplex PCRs (Shopsin *et al.*, 2003) for all the isolates. Multilocus sequence typing (MLST) was also performed from one representative of each *spa* type found in this study to determine the sequence type (ST) and the clonal complex (CC) of the isolates (www.saureus.mlst.net).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

When similar *spa* types were identified among the isolates obtained from a given mother and her respective infant (and,

therefore, suggesting a potential mother-to-infant transmission), the analysis of the clonal relatedness was performed by PFGE (Murchan *et al.*, 2003) of total DNA digested with endonuclease *Sma*I (New England Biolabs). The gel was made at 1.8% agar and run for 22 h at 6 V cm^{-1} using pulse times from 5 to 50 s. The electrophoresis was carried out in a CHEF DR-II system (Bio-Rad). A standard DNA marker (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolab) was included in the gel.

Susceptibility testing and detection of antimicrobial resistance genes

Susceptibility testing was carried out by disk-diffusion agar method for 17 antimicrobials (penicillin, oxacillin, cefoxitin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, tobramycin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim–sulfamethoxazole, linezolid, vancomycin, mupirocin and fusidic acid) following the CLSI and EUCAST recommendations (CLSI 2014; EUCAST 2014). In addition, the D-test was performed for the detection of inducible clindamycin resistance (CLSI 2014).

The presence of 25 resistance genes [*mec*(A), *blaZ*, *tet*(M), *tet*(K), *tet*(L), *tet*(O), *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(T), *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *lnu*(A), *lnu*(B), *vga*(A), *ant*(4′)-*Ia*, *aph*(3′)-*IIIa*, *aac*(6′)–*Ie-aph*(2″), *aad*(A), *aad*(E), *str*, *fus*(B) and *fus*(C)] in the *S. aureus* isolates was studied by PCR (Udo, Al-Sweilh and Noronha 2003; Lozano *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2013).

Detection of virulence genes

The virulence profile analysis was performed by PCR for detection of the following genetic determinants: Panton-Valentine leukocidin (*lukF/lukS*-PV), toxic shock syndrome toxin (*tsst-1*), and exfoliative toxin A (*eta*), B (*etb*) and D (*etd*). In addition, the genes encoding leukocidines DE (*lukD-lukE*) and M (*lukM*), aureolysin (*aur*), the biofilm-associated protein (*bap*) and the collagen-binding protein (*cna*) were also studied by PCR (Sabat *et al.*, 2000; Cucarella *et al.*, 2001; Witte *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2013).

Immune evasion cluster

The five genes that comprise the IEC (*scn*, *chp*, *sak*, and *sea* or *sep*) were studied by PCR. Depending on the presence or absence of these genes and their different combinations, all *S. aureus* isolates were classified into seven IEC types according to patterns previously described (van Wamel *et al.*, 2006).

RESULTS

Isolation of *S. aureus*

Staphylococcus aureus was isolated from milk samples of 6 out of 21 mothers (16 isolates) and from faecal samples of 12 out of 21 infants (25 isolates) (Table 1). More specifically, *S. aureus* was obtained in faecal samples of two infants at day 7, three at day 14 and of ten at day 35 after birth (Table 2). *Staphylococcus aureus* was recovered in both the milk of the mother and the faeces of the infant in six of the cases studied. Four potential cases of mother-to-infant transmission through breastfeeding were identified (Table 1).

Molecular typing of the isolates

A total of 41 *S. aureus* isolates were recovered in this study from mothers and infants, and 18 of them were considered as MRSA since they showed resistance to oxacillin and cefoxitin and were positive for the *mec*A gene. These MRSA isolates were recovered from 2 of the 21 mothers tested (9.6%) and from 5 of the 21 infants (23.8%). The remaining 23 isolates were susceptible to oxacillin and cefoxitin, lacked the *mec*A gene and were considered as MSSA.

Results of the complete characterization of all the MRSA and MSSA isolates recovered in this study are shown in Table 1. Twelve different *spa* types were detected (t002, t012, t015, t021, t122, t136, t148, t166, t322, t440, t5204, and a new *spa* type registered as t10664 in Ridom Spa Server), and the most frequent *agr* allotypes were II and III.

Staphylococcus aureus isolates belonged to eight different sequence types (ST5, ST8, ST15, ST30, ST34, ST45, ST1434 and ST1869) included into six different clonal complexes (CC5, CC8, CC15, CC30, CC45 and CC72). The MRSA isolates were typed as ST5 (*spa*-322 and *spa*-t002), ascribed to the clonal complex CC5 and typed as SCC*mec* IV. Other STs identified among MSSA were (ST/CC ascribed): ST8/CC8, ST15/CC15, ST30-ST34-ST1869/CC30, ST45/CC45 and ST1434/CC72. The predominant clonal complexes were CC5 and CC30, and they represented 43.9 and 36.6% of total isolates (Table 1).

PFGE analysis to test potential mother-to-infant *S. aureus* transmission

The *spa* typing of the *S. aureus* isolates of mothers and infants suggested a potential mother-to-infant transmission within four mother–infant pairs (cases 1 to 4). To elucidate this issue, PFGE profiles of the isolates with similar *spa* types were compared. Sharing of the MRSA clone t322/ST5/CC5-PFGE-A between mothers and infants of cases 1 and 2 was evidenced. Similarly, clones MSSA t136/ST34/CC30-PFGE-B and MSSA t021/ST1869/CC30-PFGE-C were shared by the case 3 and case 4, respectively (Table 2, Fig. 1). No similarities in *spa* types were observed among the isolates from mothers and infants of the remaining eight cases.

Susceptibility testing and detection of antimicrobial resistance genes

The MSSA isolates showed susceptibility to most antimicrobials tested except two isolates ascribed to CC30 and CC45 lineages that exhibited resistance to streptomycin and that contained the *str* gene. On the other hand, the MRSA-CC5-t322 isolates presented a multidrug-resistance phenotype with resistance to erythromycin, clindamycin, gentamicin, tobramycin and kanamycin, in addition to methicillin resistance; these isolates carried the *erm*(C), *aac*(6′)-*Ie-aph*(2″), *ant*(4′)-*Ia* and *aph*(3′)-*III* genes, and two of them also harboured the *lnu*(A) gene. In addition to the above-mentioned antimicrobials, one isolate typed as t002-ST5/CC5 showed resistance to ciprofloxacin, streptomycin and fusidic acid, containing the *str* and *fus*(C) genes (Table 1).

Virulence genes

A variable number of virulence factors was found among the 41 *S. aureus* isolates (Table 1). Interestingly, 15 MSSA isolates belonging to the clonal complex CC30 contained the *tsst-1* toxin gene (36.6%), while eight isolates (three MRSA-CC5 and five

Table 1. Main characteristics of the *S. aureus* strains recovered from the mothers and the infants in this study.

		MRSA/	N°	Molecular typing				Antimicrobial resistance		Virulence factors	
Case	Origin	MSSA	strains	*spa* type	*agr*	SCC*mec*	MLST/CC[a]	Phenotype[b]	Genotype	IEC type[c]	Other genes[d]
A. Cases of potential *S. aureus* transfer mother-to-infant											
1	Infant	MRSA	1	t322	II	IV	ST5/CC5	ERY, CLI, GEN, TOB	*erm*(C), *aac*(6′)-*Ie-aph*(2′′), *ant*(4′)-*Ia*	F	*luk-DE, aur*
	Mother	MRSA	7	t322	II	IV	**ST5/CC5**	ERY, CLI, GEN, TOB, KAN	*erm*(C),*lnu*(A), *aac*(6′)-*Ie-aph*(2′′), *ant*(4′)-*Ia*, *aph*(3′)-*III*3	F	*luk-DE, aur*^{2}, *eta*^{2}
	Mother	MSSA	1	t136	III	–	**ST34/CC30**	–	–	B	*luk-DE, aur, tsst-1*
2	Infant	MRSA	5	t322	II	IV	ST5/CC5	ERY, CLI, GEN, TOB	*erm*(C), *aac*(6′)-*Ie-aph*(2′′), *ant*(4′)-*Ia*	F	*luk-DE, aur*
	Mother	MRSA	1	t322	II	IV	**ST5/CC5**	ERY, CLI, GEN, TOB, KAN	*erm*(C), *lnu*(A), *aac*(6′)-*Ie-aph*(2′′), *ant*(4′)-*Ia*	F	*luk-DE, aur, eta*
	Infant	MSSA	1	t136	III	–	ST34/CC30	–	–	E	*aur, tsst-1*
3	Infant	MSSA	4	t015	I	–	ST45/CC45	–	–	B	*aur, cna*
	Infant	MSSA	3	t136	III	–	ST34/CC30	–	–	E	*luk-DE, eta, aur, tsst-1*
	Mother	MSSA	1	t136	III	–	**ST34/CC30**	–	–	E	*luk-DE, eta, aur, tsst-1*
4	Infant	MSSA	1	t021	III	–	**ST1869/CC30**	–	–	–	*aur, cna, tsst-1*
	Mother	MSSA	1	t021	III	–	ST1869/CC30	–	–	–	*aur, cna, tsst-1*
B. Cases of NON *S. aureus* transfer mother-to-infant											
5	Infant	MRSA	2	t322	II	IV	**ST5/CC5**	ERY, CLI, GEN, TOB	*erm*(C), *aac*(6′)-*Ie-aph*(2′′), *ant*(4′)-*Ia*	F	*luk-DE, aur*
6	Infant	MSSA	1	t015	I	–	ST45/CC45	STR	*str*	F	*luk-DE, aur, cna*
	Mother	MSSA	1	t021	III	–	ST30/CC30	–	–	–	*aur, cna, tsst-1*
7	Infant	MRSA	1	t002	II	IV	ST5/CC5	ERY, GEN, TOB, STR, FUS, CIP	*msrA*, *mrsB*, *aac*(6′)-*Ie-aph*(2′′), *ant*(4′)-*Ia*, *str*, *fus*(C)	E	*luk-DE, aur*
8	Infant	MSSA	1	t012	III	–	ST30/CC30	–	–	A	*luk-DE, aur, cna, tsst-1*
	Infant	MSSA	1	t5204	II	–	ST15/CC15	–	–	C	*luk-DE, aur*
9	Infant	MSSA	1	t122	III	–	ST30/CC30	STR	*str*	A	*aur, cna, tsst-1*
10	Infant	MSSA	1	t10664	I	–	ST8/CC8	–	–	B	*aur, cna*
11	Infant	MSSA	1	t148	I	–	**ST1434/CC72**	–	–	B	*luk-DE*
12	Infant	MRSA	1	t322	II	IV	ST5/CC5	STR	*str*	F	*luk-DE, aur*
	Mother	MSSA	3	t166	III	–	**ST34/CC30**	–	–	–	*luk-DE, aur, tsst-1, eta*^{1}
	Mother	MSSA	1	t440	III	–	ST30/CC30	–	–	B	*aur, cna, tsst-1*

[a]Those STs/CCs that were obtained by MLST are labelled in bold. Otherwise, CCs were assigned according to the *spa* type.
[b]Antimicrobials: ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; CIP, ciprofloxacin; STR, streptomycin; FUS, fusidic acid; TET, tetracycline.
[c]IEC: immune evasion cluster. IEC type E (*scn*, *sak*); IEC type F (*scn*, *chp*, *sak*, *sep*), and IEC G (*scn*, *sak*, *sep*).
[d]Superscript marks the number of strains with the characteristic, in case that not all of them have it.

Table 2. *Staphylococcus aureus* strains recovered from the 12 mother–infant cases and potential mother-to-infant transfer in four cases as assessed by PFGE-*spa*-MLST typing.

	Infant faeces isolates				PFGE assessment of similar molecular lineages in faeces and milk			
Cases	7 days	14 days	35 days	Milk isolates	Strains	*spa type*	MLST	PFGE patterns[a]
Case 1		C5515		C6429 to C6436	C5515, C6429, C6433, C6435	t322	ST5	A
Case 2	C5522, C5523	C5524, C5525	C5526, C5527	C6438	C5522, C5524, C5526, C6438	t322	ST5	A
Case 3			C5518, C5519, C5520, C5521, C5535, C5536, C5537	C6437	C5520, C5537, C6437	t136	ST34	B
Case 4			C5508	C5509	C5508, C5509	t021	ST1869	C
Case 5		C5513	C5514					
Case 6			C5516	C5517				
Case 7			C5507					
Case 8			C5511, C5512					
Case 9			C5529					
Case 10			C5530					
Case 11			C5531					
Case 12	C5533			C5532, C5534, C6439, C6440				

[a]These PFGE patterns are represented in Fig. 1

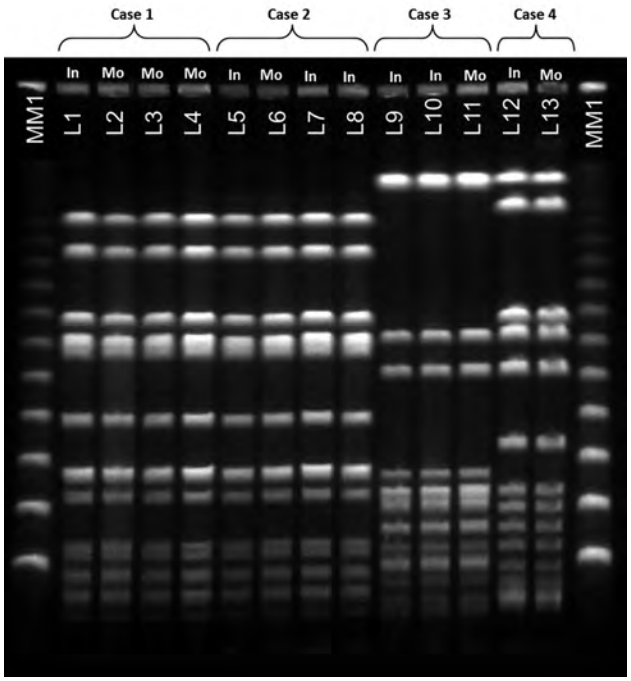


Figure 1. PFGE-*SmaI* analysis of *S. aureus* isolates in cases of potential mother-to-infant transfer. Lines 1 to 8 show strains of mothers and infants belonging to cases 1 and 2 with the PFGE profile A. Lines 9–11: strains of mother and infant belonging to case 3 with PFGE profile B. Lines 12 and 13: strains of mother and infant belonging to case 4 with PFGE profile C. Abbreviations. In: infant; Mo: mother.

MSSA-CC30) harboured the exfoliative toxin A gene (*eta*). Five of the tested infants harboured in their faeces TSST-produding *S. aureus* strains of clonal complex CC30 (in two cases, it was also detected in the milk of their mothers). The *lukD–lukE* genes were detected in 30 isolates (73.2%) being 18 of them MRSA and 12 MSSA. A total of 35 isolates harboured the *aur* gene and 12 were positive for the *cna* gene (belonging mainly to CC30 and CC45 clonal complexes). All isolates were negative for the presence of the *lukF/lukS*-PV, *lukM, bap, etb* or *etd* genes (Table 1).

Analysis of IEC genes

Only six *S. aureus* MSSA-CC30 isolates out of the 41 *S. aureus* studied did not harbour the IEC genes. Among the remaining isolates, the following IEC types were obtained (IEC type/CC): A/CC30, B/CC30-CC45-CC8-CC72, C/CC15, E/CC30-CC5 and F/CC5-CC45. The IEC types D and G were not detected in any of the isolates (Table 1).

Persistence of *S. aureus* clones

The same *S. aureus* clone was isolated from the same infant, in at least two different sampling times, in cases 2 and 5, indicating clonal persistence. In the remaining infants, *S. aureus* was isolated only in one of the three faecal samples obtained throughout the studied period (35 days).

DISCUSSION

A high rate of *S. aureus* faecal carriage (12 of 21 tested, 57%) was detected among healthy infants in this study along their first 35 days of life. MRSA strains were detected in 5 of these 12 infants, which represent 23.8% of the total infants tested. None of the MRSA-positive infants detected in this study developed an MRSA infection during the following 6 years of life (data not shown). Previous studies reported *S. aureus* faecal carriage rates ranging from 6 to 65% in healthy infants (Björkstén *et al.*, 2001; Dominguez, Zarazaga and Torres 2002; Lindberg *et al.* 2004), and notably lower MRSA carriage rates for healthy children and for people at the time of hospital admission (0–5%) (Dominguez, Zarazaga and Torres 2002; Jernigan *et al.*, 2003), although the reported percentage increased among hospitalized patients (24%)

(Klotz *et al.*, 2005). In addition, a previous study showed that the *S. aureus* colonization of the infant gut was high during the first month of life, but decreased in the subsequent weeks (Björkstén *et al.*, 2001). In our study, the highest prevalence in infants was found at 35 days after birth. In relation to the milk samples of mothers tested, two of 21 (9.6%) contained MRSA, what also represent a high carriage rate.

The genetic diversity of *spa* types detected in our study (12 different *spa* types, including a new one) is noteworthy. More than one-third of the strains showed *spa* types that could be ascribed to clonal complex CC30, a lineage that seems to be a successful colonizer of humans and has shown great ubiquity (Deurenberg *et al.*, 2009). This clonal complex seems to be related to community-acquired infections[9]. Our MSSA CC30 strains showed a low number of antimicrobial resistance genes but a remarkable virulence gene profile; in fact, over 90% of the MSSA-CC30 strains contained the toxic shock syndrome toxin gene (*tsst-1*). This association between MSSA-CC30 and *tsst-1* has been observed in other studies (Deurenberg *et al.* 2009), but at lower percentages than in our study (Mégevand *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2011). Early intestinal colonization by *S. aureus* isolates-producing toxins with superantigen function as (TSST-1) seems to promote systemic IgA responses in neonates which correlate negatively with allergy development (Lundell *et al.*, 2009).

About one-third of the *S. aureus* strains were typed as MRSA-t322-ST5-CC5, with *agr*-II and SCC*mec* IV. These strains showed a typical HA-MRSA profile (Schaumburg *et al.*, 2012), presented multidrug resistance (macrolides, lincosamines and aminoglucosides) and different antimicrobial resistance genes, including *erm(C)*, *aac(6′)-Ie-aph(2′′)*, *ant(4′)-Ia* and *aph(3′)*-III, as well as *lnu(A)* in two of them. Detection of IEC either type F or E in all these strains further supports their HA-MRSA profile (Benito *et al.*, 2013).

Interestingly, one t148/ST1434-CC72 MSSA strain was detected in one faecal sample; this *S aureus* clade had been previously associated with CA-MRSA strains detected in Asian countries (Harastani, Araj and Tokajian 2014) but, in our case, the CC72 strain lacked methicillin-resistance determinants. Similarly, a MSSA strain, typed as t10664/ST8-CC8, lacked the PVL-toxin genes and, therefore, did not show the typical CA-MRSA profile (Uhlemann *et al.*, 2014).

All our *S. aureus* strains were PVL-negative and *luk-M* negative. Moreover, none of them harboured the gene *bap* encoding the biofilm-associated protein (Cucarella *et al.*, 2001). It has been previously suggested that the prevalence of the *bap* gene among *S. aureus* strains is very low (Vautor *et al.*, 2008). Furthermore, eight strains (19.5%) carried the *eta* gene, encoding the exfoliative toxin A, and they were ascribed to clonal complexes CC5 and CC30. These strains have been reported causing staphylococcal scalded skin syndrome and impetigo (Masiuk *et al.*, 2010). In addition, 73.2% of our strains harboured the *lukD–lukE* genes, which encode a leukotoxin that is more prevalent in HA-MRSA (Uhlemann *et al.*, 2014). Twelve CC8, CC30 or CC45 strains harboured the *cna* gene, encoding a collagen-binding protein mainly associated with community acquired MRSA or MSSA (Deurenberg *et al.*, 2009).

PFGE analysis revealed four cases of possible mother-to-infant *S. aureus* transmission through breast milk (Fig. 1). Interestingly, the same clone was shared by the milk and infant faecal samples of two different cases (cases 1 and 2). Some authors hypothesize that colonized skin of parents is the source of most of *S. aureus* that colonize infants or infants gut microbiota (Gries *et al.*, 2009), while others suggest that maternity unit staff members can be another source of transmission between infants and mothers (Matussek *et al.*, 2007). Additionally, there are studies that postulate that the increasing frequency of *S. aureus* on the skin of hospitalized patients may be a potential source that facilitate nosocomial transmission (Bhalla, Aron and Donskey 2007). In our study, the clone t322-CC5, which was detected in the two cases of potential mother-to-infant transmission, might have a hospital origin, since it presented typical HA-MRSA characteristics. Infants of cases 1 and 2 were born in the same hospital but with 6 months of difference.

Human milk is a complex species-specific biological fluid adapted to satisfy the nutritional requirements of the rapidly growing infant; additionally, it educates the infant immune system and confers a certain degree of protection against pathogens. These effects reflect the synergistic action of many bioactive molecules (Ballard *et al.*, 2013). In addition, recent studies have shown that human milk is a continuous source of bacteria for the infant gut, and both culture-dependent and microbiome studies have revealed that staphylococci, mainly CNS, constitute the dominant bacteria in this biological fluid (Fernández *et al.*, 2013). Interestingly, both *S. aureus* and *S. epidermidis* are among the microorganisms with the highest ability to metabolize human milk oligosaccharides (Hunt *et al.*, 2012). Different studies indicate that some bacteria present in the maternal gut, including staphylococci, can reach the mammary gland during late pregnancy and lactation through a mechanism involving gut monocytes (Martin *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2007). Early gut colonization by *S. aureus* isolates, including toxigenic isolates, influences the level of soluble CD14 or of IgA circulating in plasma of neonates, what affect the development of the immune system and the risk of allergy development (Lundell *et al.*, 2007, 2009).

Presence of *S. epidermidis* in the infant gut seems to be a differential feature of the faeces of breast-fed infants when compared to those of formula-fed infants (Borderon *et al.*, 1996; Adlerberth *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2008). In this context, the abundant presence of this species in all the milk and faecal samples tested in this study (data not shown) (Jiménez *et al.*, 2008) may explain, at least partly, why all the infants remained healthy throughout the study period and also in the following years. Indeed, CNS provided by breast milk can be particularly useful to reduce the acquisition of undesired pathogens by infants exposed to hospital environments. It has been proposed that *S. epidermidis* and other CNS may have a probiotic function by preventing colonization of the host by more severe pathogens, such as *S. aureus* (Otto *et al.*, 2009). In fact, some *S. epidermidis* strains that inhibit *in vivo* colonization by *S. aureus* have been postulated as a future strategy to eradicate such pathogen from mucosal surfaces (Iwase *et al.*, 2010; Park, Iwase and Liu 2011).

In conclusion, a high rate of *S. aureus* faecal carriage was observed among healthy infants in this study, including MRSA strains. Four cases of mother-to-infant *S. aureus* transmission through breast milk were identified, highlighting the ability of this microorganism to be transmitted by this route and to establish in the infant gut microbiota. In this regard, it is important to note that more research is needed to understand the implications or possible roles of this mother–infant microbial transmission. Future studies should focus on the effect of this early *S. aureus* intestinal colonization of infants (including colonization by MRSA isolates) on their correct immune system development, the evolution of *S. aureus* colonization along the first years of infant life and the impact on the establishment of other bacteria of the intestinal microbiome.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the text revision performed by F. Ruiz-Larrea.

FUNDING

This work was partially supported by Project SAF2012–35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Daniel Benito has a predoctoral fellowship FPI from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and C. Lozano is financed by project SAF2012–35474.

Conflicts of interest. Do not exist in relation with this manuscript.

REFERENCES

Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, *et al*. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle. *Pediatr Res* 2006;**59**:96–101.

Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin N Am* 2013;**60**:49–74.

Benito D, Lozano C, Gómez-Sanz E, *et al*. Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. *Microb Ecol* 2013;**66**:105–11.

Bhalla A, Aron DC, Donskey CJ. *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of *S. aureus* on skin of hospitalized patients. *BMC Infect Dis* 2007;**7**:105.

Björkstén B, Sepp E, Julge K, *et al*. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**108**:516–20.

Borderon JC, Lionnet C, Rondeau C, *et al*. Current aspects of fecal flora of the newborn without antibiotherapy during the first 7 days of life: *Enterobacteriaceae*, enterococci, staphylococci. *Pathol Biol* 1996;**44**:416–22.

Bourgeois-Nicolaos N, Lucet JC, Daubié C, *et al*. Maternal vaginal colonisation by *Staphylococcus aureus* and newborn acquisition at delivery. *Paediatr Perinat Ep* 2010;**24**:488–91.

Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012;**13**:260–70.

Clinical Laboratory Standards Institut. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty two informational supplement M100-S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.

Cucarella C, Solano C, Valle J, *et al*. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001;**183**:2888–96.

Delgado S, García P, Fernández L, *et al*. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol Med Mic* 2011;**62**:225–35.

Deurenberg RH, Rijnders MI, Sebastian S, *et al*. The *Staphylococcus aureus* lineage-specific markers collagen adhesin and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence typing clonal complexes within *spa* clonal complexes. *Diagn Micr Infec Dis* 2009;**65**:116–122.

Dominguez E, Zarazaga M, Torres C. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:2638–41.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters Version* 4.0, January 2014. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)*. Available from http://www.eucast.org.

Fernández L, Langa S, Martín V, *et al*. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;**69**:1–10.

Gries DM, Zemzars TF, Gibson KA, *et al*. A pilot study to assess frequency of carriage and routes of acquisition of *Staphylococcus aureus* by healthy infants. *Am J Infect Control* 2009;**37**:598–600.

Harastani HH, Araj GF, Tokajian ST. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from a major hospital in Lebanon. *Int J Infect Dis* 2014;**19**:33–8.

Harmsen D, Claus H, Witte W, *et al*. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:5442–8.

Hunt KM, Preuss J,, Nissan C, *et al*. Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Appl Environ Microb* 2012;**78**:4763–70.

Iwase T, Uehara Y, Shinji H, *et al*. *Staphylococcus epidermidis* sp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010;**465**:346–9.

Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, *et al*. Relationship between *Staphylococcus aureus* genetic background virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002;**70**:631–41.

Jernigan JA, Pullen AL, Flowers L, *et al*. Prevalence of and risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the time of hospital admission. *Infect Cont Hosp Ep* 2003;**24**:409–14.

Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, *et al*. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol* 2008;**8**:143.

Jimenez-Truque N,, Tedeschi S, Saye EJ, *et al*. Relationship between maternal and neonatal *Staphylococcus aureus* colonization. *Pediatrics* 2012;**129**:1252–9.

Klotz M, Zimmermann S, Opper S, *et al*. Possible risk for re-colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by fecal transmission. *Int J Hyg Envir Heal* 2005;**208**:401–5.

Leshem E, Maayan-Metzger A, Rahav G, *et al*. Transmission of *Staphylococcus aureus* from mothers to newborns. *Pediatr Infect Dis J* 2012;**31**:360–3.

Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, *et al*. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:530–4.

Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, *et al*. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol* 2011;**301**:500–5.

Lundell AC, Adlerberth, Lindberg E, *et al*. Increased levels of circulating soluble CD14 but not CD83 in infants are associated with early intestinal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Clin Exp Allergy* 2007;**37**:62–71.

Lundell AC, Hesselmar B, Nordström I, *et al*. High circulating immunoglobulin A levels in infants are associated with intestinal toxigenic *Staphylococcus aureus* and a lower frequency of eczema. *Clin Exp Allergy* 2009;**39**:662–70.

Martin R, Langa S, Reviriego C, *et al*. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Tech* 2004;**15**:121–7.

Masiuk H, Kopron K, Grumann D, *et al*. Association of recurrent furunculosis with Panton-valentine leukocidin and the

genetic background of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2010;**48**:1527–35.

Matussek A, Taipalensuu J, Einemo IM, *et al*. Transmission of *Staphylococcus aureus* from maternity unit staff members to newborns disclosed through *spa* typing. *Am J Infect Control* 2007;**35**:122–5.

Mégevand C, Gervaix A, Heininger U, *et al*. Molecular epidemiology of the nasal colonization by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Swiss children. *Clin Microbiol Infec* 2010;**16**:1414–20.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, *et al*. Harmonization of pulsed-field Gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:1574–85.

Otto M. *Staphylococcus epidermidis*; the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;**7**:555–67.

Park B, Iwase T, Liu GY. Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *Plos One* 2011;**6(10)**:e25880.

Pérez PF, Doré J, Leclerc M, *et al*. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007;**119**:e724–32.

Sabat A, Kosowska K, Poulsen K, *et al*. Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2000;**68**:973–6.

Schaumburg F, Köck R, Mellmann A, *et al*. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J Clin Microbiol* 2012;**50**:3186–92.

Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, *et al*. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:456–9.

Sim K, Powell E, Shaw AG, *et al*. The neonatal gastrointestinal microbiota: the foundation of future health?. *Arch Dis Child-Fetal* 2013;**98**:362–64.

Udo EE, Al-Sweilh N, Noronha BC. A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. *J Antimicrob Chemoth* 2003;**51**:1283–6.

Uhlemann AC, Otto M, Lowy FD, *et al*. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2014;**21**:563–74.

Van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, *et al*. Co-evolutionary aspects of human colonization and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2009;**9**:32–47.

Van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, *et al*. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. *J Bacteriol* 2006;**188**:1310–5.

Vautor E, Abadie G, Pont A, *et al*. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animal species. *Vet Microbiol* 2008;**127**:407–11.

Witte W, Strommenger B, Stanek C, *et al*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:255–8.

FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE
Volume 11, Number 5, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/fpd.2013.1689

Genetic Lineages, Antimicrobial Resistance, and Virulence in *Staphylococcus aureus* of Meat Samples in Spain: Analysis of Immune Evasion Cluster (IEC) Genes

Daniel Benito, Paula Gómez, Carmen Lozano, Vanesa Estepa, Elena Gómez-Sanz, Myriam Zarazaga, and Carmen Torres

Abstract

The objective of this study was to determine the rate of contamination by *Staphylococcus aureus* in 100 meat samples obtained during 2011–2012 in La Rioja (Northern Spain), to analyze their content in antimicrobial resistance and virulence genes, as well as in immune evasion cluster (IEC) genes, and to type recovered isolates. Seven of 100 samples (7%) contained *S. aureus*: 6 samples harbored methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and 1 pork sample harbored methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The MRSA isolate corresponded to the ST398 genetic lineage with a multidrug resistance profile and the absence of human IEC genes, which pointed to a typical livestock-associated MRSA profile. MRSA isolate was ascribed to the *spa*-type t011, *agr*-type I, and SCC*mec*-V and showed resistance to erythromycin, clindamycin, tetracycline, and streptomycin, in addition to β-lactams. The remaining six MSSA strains belonged to different sequence types and clonal complexes (three isolates ST45/CC45, one ST617/CC45, one ST5/CC5, and one ST109/CC9), being susceptible to most antibiotics tested but showing a wide virulence gene profile. Five of the six MSSA strains (except ST617/CC45) contained the enterotoxin *egc*-cluster or *egc*-like-cluster genes, and strain ST109/CC9 contained *eta* gene (encoding exfoliatin A). The presence of human IEC genes in MSSA strains (types B and D) points to a possible contamination of meat samples from an undefined human source. The presence of *S. aureus* with enterotoxin genes and MRSA in food samples might have implications in public health. The IEC system could be a good marker to follow the *S. aureus* contamination source in meat food products.

Introduction

Staphylococcus aureus is a cause of food poisoning due to its capacity to produce enterotoxins that can contaminate food products (Argudín *et al*., 2010), and its surveillance is an issue of special growing interest (Wendlandt *et al*., 2013). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) of the sequence type ST398 is now a global problem due, in part, to its great ubiquity in different environments (Wendlandt *et al*., 2013). MRSA ST398 was initially detected in farm animals, especially in pigs, and was considered LA-MRSA (livestock-associated MRSA); nevertheless, MRSA ST398 has been increasingly detected in other animals and in humans, either as colonizer or causing infections (Lozano *et al*., 2011), as well as in food products (Wendlandt *et al*., 2013).

In recent years, there has been special interest to know the genetic lineages of *S. aureus* that are circulating in different environments in order to track its evolution in the different niches. Genetic lineages adapted to humans frequently contain the genes of the immune evasion cluster (IEC) system; however these genes are generally nondetected among lineages mostly adapted to animals. Each *S. aureus* lineage seems to evade the host immune responses differently, but they can adapt to new host environments by the acquisition of the IEC genes (McCarthy and Lindsay, 2013). The IEC system contains the *scn*, *chp*, *sak*, and *sea* or *sep* genes, showing different functions to achieve the survival of *S. aureus* within human innate defenses (van Wamel *et al*., 2006).

A previous study performed in our group in 2007–2009 detected MRSA in 1.6% of food samples in La Rioja (Northern Spain), but the prevalence of methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) or the presence of virulence or IEC genes was not evaluated (Lozano *et al*., 2009). The aim of the present study was to analyze the rate of meat contamination by MRSA and/or MSSA in food samples from La Rioja during 2011–2012, as well as to perform the molecular characterization of detected isolates in order to check the circulating lineages and their possible human or animal origins.

Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

Materials and Methods

One hundred meat samples (pork, 34; chicken, 31; turkey, 15; beef, 15; and lamb, 5) were collected in large supermarkets (47 samples) or small butcheries (53 samples) in the La Rioja region. Samples (0.3 g) were suspended in 3 mL of saline solution (0.9%) and 100 μL were inoculated in brain-heart-infusion (BHI) broth (Becton-Dickinson, France) containing 6.5% NaCl, and incubated at 37°C for 24–36 h. Then, 200 μL of the suspension was seeded on mannitol–salt–agar plates (Becton-Dickinson) and ORSAB plates (Oxoid, England) supplemented with 2 mg/L oxacillin to recover *S. aureus* and MRSA, respectively. Both types of plates were incubated at 37°C for 24–48 h. Two presumptive *S. aureus* or MRSA colonies per sample were selected and identified by DNase and by multiplex polymerase chain reaction (PCR) of *nuc* and *mecA* genes (Benito *et al*., 2013), although only one isolate/sample was further studied when a similar resistance profile was detected.

Recovered *S. aureus* isolates (both MRSA and MSSA) were typed by (1) *spa* (www.ridom.com), (2) *agr*, (3) multilocus sequence typing (saureus.mlst.net), and (4) staphylococcal-cassette-chromosome *mec* (SCC*mec*) (Lozano *et al*., 2011). Resistance phenotype to 17 antibiotics was determined by the disk-diffusion method (CLSI, 2012; CA-SFM, 2011), and the presence of 21 resistance genes was analyzed by PCR (Benito *et al*., 2013). Moreover, 14 virulence genes (including *lukF/lukS*-PV, *tsst-1*, *eta, etb*, *lukD-lukE, lukM, aur, bap, cna, hla, hlb, hld, hlg,* and *hlgv*) and 18 staphylococcal enterotoxins genes (*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser,* and *seu*) were tested by multiplex PCR (Jarraud *et al*., 2001; Hwang *et al.,* 2007). The five genes of the IEC cluster (*scn, chp, sak, sea,* and *sep*) were studied by PCR (Van Wamel *et al.,* 2006). Positive and negative controls for each PCR were used.

Results and Discussion

S. aureus was detected in 7 of the 100 meat samples collected (7%), of which 6 samples contained MSSA and only 1 sample harbored MRSA (1%). Five of the contaminated samples were from small butcheries and two were obtained from large supermarkets. One isolate/positive-sample was further studied. Table 1 shows the characteristics of the seven *S. aureus* isolated in this study.

The MRSA strain was recovered from a pork meat sample, and was typed as SCC*mec* typeV, *spa*-type-t011, *agr*-I, and sequence-type ST398 (included in CC398 clonal complex). This strain exhibited a multidrug-resistance phenotype and genotype, lacked the *egc*-cluster genes, and was negative for IEC genes, presenting the typical LA-MRSA profile.

The 6 MSSA isolates were detected from pork ($n=3$) or chicken ($n=3$) samples. Three of them were typed as *agr*-type I, *spa*-type t015, and ST45/CC45, showed penicillin resistance, contained the *egc*-like cluster (*seg, sei, sem, sen, seo,* and *seu*) and the *cna* toxin gene, as well as the IEC system (type B). These ST45/CC45 isolates were recovered from two pork and one chicken samples from two different butcheries. The other three MSSA isolates were typed as ST5/CC5, ST109/CC9, and ST617/CC45, with different antibiotic-resistance profiles (Table 1). The strains CC5 and CC9 harbored all the enterotoxin genes included in the

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS RECOVERED FROM MEAT SAMPLES IN THIS STUDY

		Molecular typing				*Antimicrobial resistance*		*Virulence factors*	
Isolate	*Origin*	spa-*type*	agr	SCCmec	*MLST/CC*	*Phenotype*	*Genotype*	*IEC type*[a]	*Other genes*
C5932	Pork	t011	I	V	ST398/CC398	OXA, FOX, PEN, ERY, CLI, TET, STR	*mecA, blaZ, erm*(C), *tet*(M), *tet*(K), *str*	Negative	*hla, hlb, hld, hlg, cna, aur*
C5934	Pork	t002	II	Negative	ST5/CC5	TET	*tet*(K)	B	*luk-DE, hlgv, hld, aur, egc*[b]
C5933	Pork	t015	I	Negative	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*hlg, hld, cna, aur, egc-like*[c]
C5938	Pork	t015	I	Negative	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*hlg, hld, cna, aur, egc-like*[c]
C5935	Chicken	t015	I	Negative	ST45/CC45	PEN	*blaZ*	B	*hlg, hld, cna, aur, egc-like*[c]
C5937	Chicken	t305	I	Negative	ST617/CC45	TET	*tet*(M)	D	*luk-DE, hlgv, hld*
C5936	Chicken	t209	II	Negative	ST109/CC9	ERY, CLI	*erm*(A)	B	*eta, hld, aur, egc*[b]

[a]IEC, immune evasion cluster. IEC type B (*scn, chp,* and *sak*) and IEC type D (*scn, sak,* and *sea*).
[b]*egc* cluster (*seg, sei, sem, sen,* and *seo*).
[c]*egc*-like cluster (*seg, sei, sem, sen, seo,* and *seu*).
SCC, staphylococcal-cassette-chromosome; MLST, multilocus sequence typing; OXA, oxacillin; FOX, cefoxitin; PEN, penicillin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TET, tetracycline; STR, streptomycin. Other antibiotics tested: kanamycin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, mupirocin, fusidic acid, linezolid, vancomycin, trimethoprim–sulfamethoxazole, and chloramphenicol.

egc-cluster (*seg, sei, sem, sen,* and *seo*), and the IEC-type B system. Moreover, the strain typed as ST109/CC9 carried the *eta* gene, encoding exfoliatin A. The strain ST617/CC45 lacked *egc*-cluster, and presented the IEC type D. The presence of the *egc* cluster among our MSSA strains is relevant due to the potential role of *egc*-encoded toxins SEG and SEI in staphylococcal food poisoning (Jarraud *et al.*, 2001; Argudín *et al.*, 2010).

All *S. aureus* recovered in this study (both MRSA and MSSA) lacked the genes of Panton-Valentine leukocidin (*lukF/lukS*-PV) and of shock syndrome toxin 1.

The carriage rate of *S. aureus* and MRSA among the pork samples in our study was 11.7% and 2.9%, respectively. Regarding chicken samples, the carriage rate of *S. aureus* was 10%, while no MRSA-positive sample was identified. *S. aureus* was not recovered among the food samples of other origins tested. Other studies have shown higher *S. aureus* rates in meat samples (16%–45%) (Wendlandt *et al.*, 2013). In the case of MRSA, percentages of MRSA-positive samples varied with the sample collections investigated in different countries (0%–37%) (Wendlandt *et al.,* 2013; de Boer *et al.,* 2009). The low rate of MRSA detected in meat samples in our study was similar to that found some years before in the same region (Lozano *et al*., 2009).

The presence of the genes of the IEC system in our MSSA strains belonging to CC5, CC9, and CC45 clonal complexes points to a food contamination by an undefined human source. Instead, our MRSA ST398 strain presented the typical characteristics of an animal-related lineage, as suggested by its broad antibiotic-resistance profile, including tetracycline (agent widely used in animal husbandry, especially in pigs), and also due to the absence of IEC genes. The IEC system could be a good marker to follow the *S. aureus* contamination source in food products.

Acknowledgments

This work was supported by Project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Daniel Benito has a predoctoral fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain, and Paula Gómez and Vanesa Estepa have predoctoral fellowships of the Universidad de La Rioja (Spain).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins (Basel) 2010;2: 1751–1773.

Benito D, Lozano C, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. Microb Ecol 2013;66:105–111.

[CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty two informational supplement (M100-S22). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2012.

[CA-SFM] Comité de l'Antibiograme de la Societé Française de Microbiologie: Recommandations 2010 (January 2010 edition), 2010. Available at: http://www.sfm-microbiologie.org

de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JT, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, van Oosterom RA, Vila A, Heuvelink AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. Int J Food Microbiol 2009;134:52–56.

Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, Jung WK, Kim JM, Park YH. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. Int J Food Microbiol 2007;117:99–105.

Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol 2001;166:669–677.

Lozano C, López M, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C, Zarazaga M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. J Antimicrob Chemother 2009;64:1325–1326.

Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: Clonal relationship and detection of *lnu*(A) gene. Clin Microbiol Infect 2011;17:923–927.

McCarthy AJ, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study. Infect Genet Evol 2013;19:7–14.

Van Wamel WJ, Rooijakkers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta hemolysin converting bacteriophages. J Bacteriol 2006;188:1310–1315.

Wendlandt S, Schwarz S, Silley P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A food-borne pathogen? Annu Rev Food Sci Technol 2013;4:117–139.

Address correspondence to:
Carmen Torres, PhD
Área Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de La Rioja
Madre de Dios 51
26006 Logroño, Spain

E-mail: carmen.torres@unirioja.es