



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

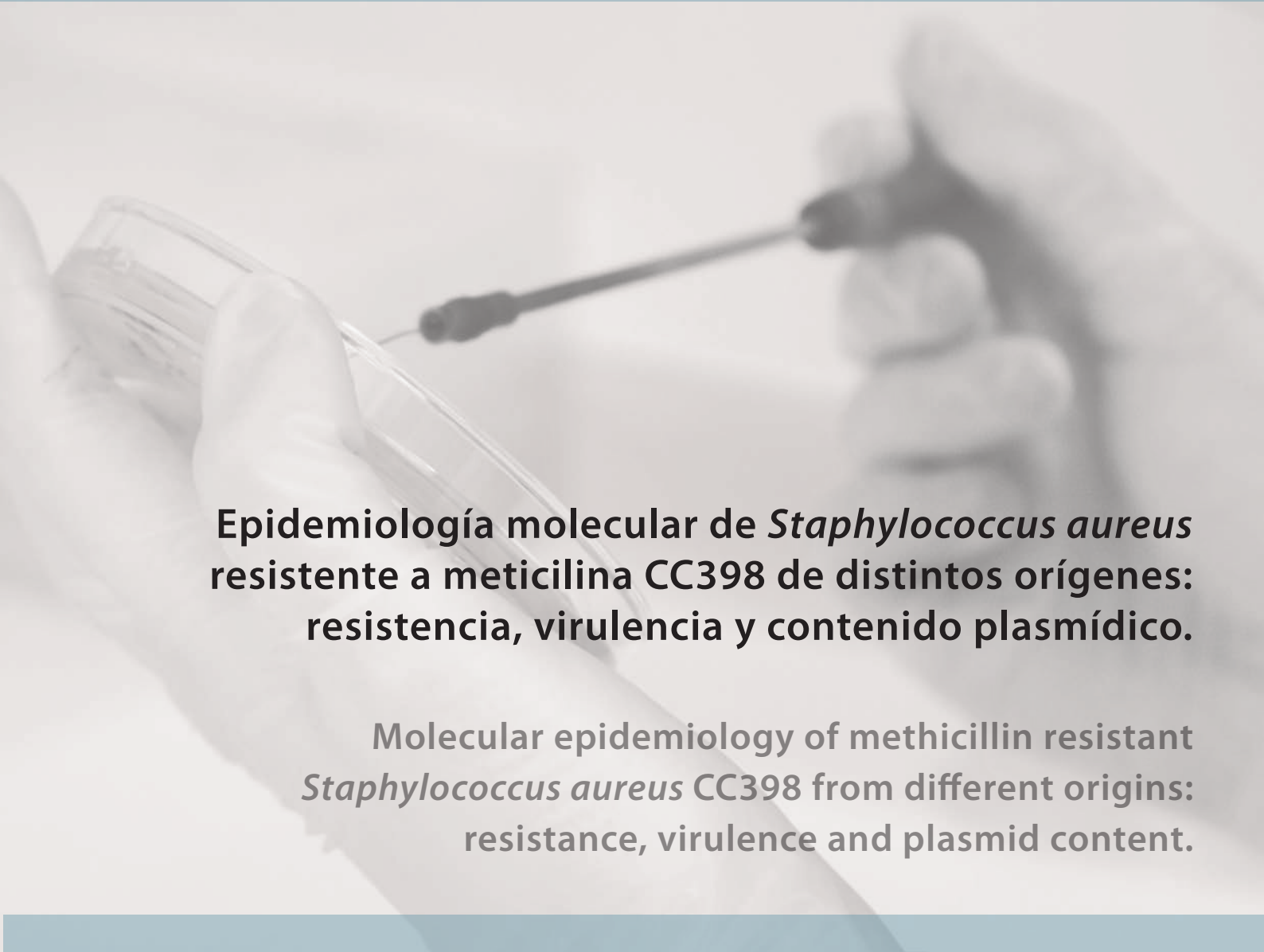
Título
Epidemiología molecular de Staphylococcus aureus resistente a meticilina del linaje CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico
Autor/es
Carmen Lozano Fernández
Director/es
Carmen Torres Manrique y Mirian Zarazaga Chamorro
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina del linaje CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico, tesis doctoral

de Carmen Lozano Fernández, dirigida por Carmen Torres Manrique y Mirian Zarazaga Chamorro (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, 2014
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es



Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico.

Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC398 from different origins: resistance, virulence and plasmid content.

Carmen Lozano Fernández

Tesis Doctoral con Mención Internacional

Logroño 2012

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA



Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA CC398 DE DISTINTOS ORÍGENES: RESISTENCIA, VIRULENCIA Y CONTENIDO PLASMÍDICO.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* CC398 FROM DIFFERENT ORIGINS: RESISTANCE, VIRULENCE AND PLASMID CONTENT.

Memoria presentada por **CARMEN LOZANO FERNÁNDEZ** para optar al título de Doctora con la mención internacional por la Universidad de La Rioja.

Logroño, Julio 2012



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

Dra. **MYRIAM ZARAZAGA CHAMORRO**, Profesora Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja

Por la presente declaran que,

La memoria titulada **“Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico”**, que presenta Dña. CARMEN LOZANO FERNÁNDEZ, Licenciada en Farmacia, 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 Julio de 2012.

Fdo.: Carmen Torres Manrique

Fdo.: Myriam Zarazaga Chamorro

”Solo darme cuenta de que en esta vida lo más importante no es llegar al destino, comprendí que lo realmente importante es cómo y con quién compartes tu camino”

Ruben Fernández

A mis padres y mis hermanos

Echando la vista atrás parece increíble que ahora este escribiendo estas líneas en las cuales he pensado infinidad de veces. Aún recuerdo cuando iba a comenzar la universidad y decía que lo que yo quería hacer, sin saber bien qué significaba, era investigar. Tras terminar los estudios, las dudas me invadieron y, finalmente, decidí hacer realidad ese sueño. No podía imaginar el esfuerzo, la dedicación y, ante todo, la superación personal que significaba. Cuando veo que esto llega a su fin, no puedo evitar el pensar en todas las personas que me han acompañado a lo largo de este trabajo y, que sin ellas y sin su ayuda, no estaría donde estoy.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de tesis Carmen Torres y Myriam Zarazaga el darme la oportunidad de formar parte de su equipo. Aún recuerdo el primer día que entré en el despacho de Carmen y como me acogió sin dudarle. Debo decir que ha sido para mí un gran ejemplo a seguir, capaz de contagiarme su pasión por la investigación y de animarme tanto a nivel profesional como personal. Gracias Myriam por las horas de trabajo que hemos pasado juntas, buscando información, revisando artículos, introduciendo secuencias en el GenBank,... pero, ante todo, ¡gracias por ser tan cercana! Siempre que tenía una duda y no sabía qué paso debía ser el siguiente, sabía que tanto tu despacho como el de Carmen estaban abiertos para mí.

No puedo olvidarme de otros miembros del Área de Bioquímica y Biología Molecular. Gracias Fernanda Ruiz por esa organización, que tanta falta hace en un laboratorio, y por asegurarte de que siempre tuviésemos el material necesario; y gracias, Carmen Tenorio, por la ayuda prestada y por hacer más sencilla mi iniciación en el mundo de la docencia.

Durante la elaboración de una tesis son muchas las horas que se pasan en el laboratorio y, por ello, quiero agradecer a todos mis compañeros el ayudarme siempre que lo he necesitado y el hacer que el “labo” fuese como un segundo hogar para mí. Me alegra enormemente decir que entre todos ellos sé que me llevo grandes amigos. Me gustaría comenzar por mis compañeros de “estafilos”, en especial por Titus, quien ha estado a mi lado durante todo este camino. Comenzaste un añito más tarde y juntas emprendimos los pasos para conocer qué tenía que decirnos esta bacteria. Son muchas las cajas de primers que hemos rellenado juntas, los congresos a los que hemos asistido, las comeduras de cabeza cuando algo no quería salir... Sin ti, pequeña Ti, esta tesis no sería lo que es y por ello y por el apoyo personal que me has dado durante estos años quería darte ¡mil gracias! Dani, a ti me gustaría agradecerte los meses que fuiste mi

ayudante, haciendo PCR's y aprendiendo conmigo como extraer ¡mis primeros plásmidos! Pauli, qué puedo decir de ti, entraste como mi "pupila" sacando adelante el estudio de la tetraciclina. No te imaginas como me alegra que decidieses hacer la tesis y más aún que sea sobre ¡"estafilos"! Sólo hay una cosa que me da rabia, y es que no hubieses llegado antes al laboratorio, porque en poco tiempo te has convertido en alguien muy especial para mí. Gracias por tu ternura y comprensión, y por toda la ayuda prestada tanto a nivel personal como en la elaboración de este trabajo. Sólo quiero que sepas que, aunque este terminando, de mí no te libras tan fácilmente:); No cambies nunca! Me gustaría agradecer también a María, mi única compañera de Gram positivos durante mi primer año, el haberme explicado tantas cosas, cómo hacer PFGE, cómo extraer plásmidos, cómo mirar entornos... Sin ti, el inicio de esta tesis hubiese sido mucho más complicado. Y a Raquel, quien durante un tiempo siguió tus pasos y aportó aire fresco al laboratorio, por esa simpatía que tanto la caracteriza.

No me puedo olvidar del resto de mis compañeros, ¡los Gram negativos! Gracias Elenita por haberme apoyado tantísimo durante toda mi tesis. Juntas hemos pasado los duros inicios y los "estreses" finales. Gracias por tus ánimos, tanto dentro como fuera del trabajo. Has sido de las personas que más ha entendido mis agobios cuando las cosas no salían como debían y la que más dudas me has resuelto con las hibridaciones, CMI's, ... ¡Qué hubiese sido de mí sin el otro enanito trabajador! Gracias, Sergio, por tu paciencia cada vez que necesitaba ayuda con alguna herramienta informática, por el cambio de emisora de radio ;), y por esos caminos filosóficos volviendo juntos a casa. Gracias Vane, por tu generosidad, por esa mesa que tan bien me ha venido para escribir esta tesis y porque siempre que necesite ayuda estuviste dispuesta a dármela.

Gracias al grupo del CIBIR: Yoly, gracias por tener siempre una palabra amable hacia mí y porque nunca olvidaré ese viaje a Túnez; Nerea, por esa sonrisa tan contagiosa que tanto me gusta ¡viva mi Dolly!; María, mi compi de cursos de doctorado; y Bea, por los buenos ratos que hemos pasado en los congresos.

Quiero agradecer también al grupo del vino, porque aunque dedicados a distintos campos, hemos compartido trabajo, tiempo y material. Gracias, Roci, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas, por el esfuerzo compartido de mejorar nuestro inglés, por esas películas en tu casa, ... porque sin ti no nos hubiésemos juntado en tantas cenas ni hubiésemos ido a París ni a Santander ¡pom pom! Y, sobre todo, por recordarme que para que el trabajo salga adelante ¡un café siempre viene bien! Sonia, gracias por preocuparte por mí cuando los nervios delataban que algo me pasaba. Cauré,

nuestro brasileño, mil gracias por hacerme participe de momentos muy importantes de tu vida y porque siempre has sido muy buen compañero. Y Lorena, por ese curso en Santander y ¡nuestras clases con Patrick!

Quiero agradecer también a los que estaban en el “labo” y ya no están y a los que alguna vez pasaron por él: Laura, Santi, Eva, Lara, María José,...A todos nuestros compañeros de Túnez por lo bien que os portasteis conmigo cuando fui allí y por la alegría que habéis aportado al laboratorio, gracias Haythem por tus bromas, Rym por tu dulzura, y gracias también a Sarra, Leila, Ahlem y Karim. A los portugueses Carlos, Catarina, Hajer, Álex, Céline, Margarida y Joana y a las argelinas Souhila y Farida por los buenos momentos pasados. A mis mejicanos Rosa, Paty y Gerardo porque hacían del laboratorio un lugar más cálido y ¡por esos riojanos jóvenes y frescos en los que tanto hemos disfrutado!

Gracias también a Frank Aarestrup por permitirme realizar una estancia en su laboratorio de Copenhague. Fue un gran reto personal y una gran experiencia de la que me llevé muy buenos recuerdos y gran cantidad de conocimientos. Mil gracias, Lourdes, porque hiciste que mi estancia allí fuese mucho más fácil, coincidimos poco tiempo pero, aún cuando te marchaste, seguiste ayudándome vía e-mail y telefónica. Sin ti no hubiese podido realizar el trabajo de plásmidos. Gracias, Lina, por ayudarme a encontrar alojamiento algo que parecía ¡misión imposible! A Jacob, Lisbeth e Inge por su paciencia en explicarme cómo funcionaba el laboratorio y porque siempre que necesite una contraseña, información o saber dónde estaban las cosas estuvisteis allí, mange tak! Y muchísimas gracias, Loreto, por esos meses que coincidimos allí, por el turismo que realizamos juntas y porque significaste mucho para mí ¡Qué importante fue tener una amiga como tú estando lejos de casa!

Gracias a todas aquellas personas que me han facilitado las cepas que han formado parte de este estudio: Dra. Carmen Aspiroz (Hospital Royo-Villanova), Dr. Antonio Rezusta (Hospital Universitario Miguel Servet), Dra. Monstserrat Ruiz García (Hospital General Universitario de Elche), Dra. Carmen Simon (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza) y Dra. Inés Olarte (Hospital San Pedro). Mi agradecimiento, también, a los diferentes miembros del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja por su interés en el desarrollo de esta tesis. Y gracias también al Ministerio de Educación y Ciencia por haberme concedido una beca predoctoral que me ha dado el sustento económico durante estos años no sólo en Logroño sino también en Dinamarca.

A la hora de realizar una tesis no sólo son importantes las personas con las que trabajas sino aquellas que te apoyan y te ayudan desde fuera. Por ello, quiero agradecer a todos mis amigos las muestras nasales que me habéis dado;), esos jueves en la pinta que me servían de distracción, el hacerme sonreír llamándome bacterióloga, las visitas al laboratorio, el venir a verme a Copenhague, el escucharme desahogarme cuando me hacía falta,...y por ser mi compañera de tesis Logroño-Zaragoza y ser la que más entiende lo que conlleva este trabajo mil gracias a Silvi. ¡Sé que serás una gran doctora! No te imaginas lo orgullosa que estoy de ti.

Gracias, Rubén, porque sin ti estos años hubiesen sido mucho más duros. A tu lado consigues que sea una persona más tranquila, sabes calmarme, escucharme y sobre todo animarme y hacerme reír. Mil gracias por recordarme que la vida es algo más que el trabajo y que hay que aprender a desconectar. De la gente ajena al laboratorio has sido la que más ha entendido en qué consistía esta tesis. Contigo podía hablar de PCRs, hibridaciones,...e incluso ¡me has propuesto soluciones cuando no podía disolver los antibióticos! Mil gracias por venir a verme al laboratorio y por hacer, mi comienzo en Copenhague, mucho más sencillo.

Y como no podía ser de otra manera quiero agradecer a toda mi familia el apoyo constante que siempre me han dado. Mil gracias por estar ahí cuando lo necesito y porque yo no sería lo que soy si no fuese por vosotros. Gracias, papá, por tu infinita paciencia, por tu ayuda incondicional, por animarme sea cual sea la decisión que tome y por consolarme siempre que los nervios me invaden. Mamá, quiero agradecerte el creer firmemente en mí, confiando en que siempre seré capaz de alcanzar las metas que me proponga. Cómo me gusta que me digas ¡qué grande eres hija! A mi hermano Germán, gracias por alentarme a hacer esta tesis, por ser un gran ejemplo a seguir, por los ánimos que me diste cuando estaba en Copenhague y ¡por los mejores sobrinos del mundo! A mi hermana Irene, porque sin ti todo lo que hago sería muchísimo más difícil. Hasta en mi tesis has colaborado como la que más, en el diseño de la portada, en la maquetación, ayudándome con el inglés... ¡sin ti esta tesis no sería tan bonita! Mil gracias por escucharme siempre que lo necesito y por conseguir que nunca me sienta sola porque, aún en la distancia, ¡siempre estas a mi lado! Por todo esto, quiero dedicar esta tesis especialmente a mi familia, porque sin ellos yo no habría sido capaz de llegar hasta aquí ¡Esta tesis es tanto vuestra como mía!

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii

INTRODUCCIÓN

1. <i>Staphylococcus aureus</i> COMO AGENTE PATÓGENO OPORTUNISTA.....	3
2. <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METICILINA (SARM).....	4
3. TIPADO MOLECULAR.....	5
3.1. Tipado del SCCmec.....	5
3.2. Tipado del locus <i>agr</i>	7
3.3. Tipado por Multilocus Sequence Typing (MLST).....	9
3.4. Tipado de la región polimórfica del gen <i>spa</i>	9
3.5. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	9
4. EPIDEMIOLOGÍA DE <i>S. aureus</i> RESISTENTE A METICILINA.....	11
4.1. SARM asociado a ambientes hospitalarios (SARM-AH).....	12
4.2. SARM en la comunidad (SARM-AC).....	14
4.3. SARM en animales.....	16
5. APARICIÓN Y DISEMINACIÓN DE SARM CC398.....	17
5.1. Transferencia de SARM CC398 de animales al hombre.....	18
5.2. Otros linages de SARM-AG.....	19
6. DETECCIÓN DE SARM EN ALIMENTOS.....	21
7. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS NO β-LACTÁMICOS EN <i>S. aureus</i>.....	22
8. FACTORES DE VIRULENCIA.....	28
9. ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES.....	30
9.1. EGMs que portan genes de resistencia en <i>S. aureus</i>	35
9.2. EGM que portan factores de virulencia en <i>S. aureus</i>	37

OBJETIVOS	41
OBJETIVES	42
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. CEPAS ESTUDIADAS	45
2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE CEPAS	55
3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	56
4. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	57
4.1. Método de difusión por disco o antibiograma	57
4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por dilución en agar	59
4.3. Determinación de la CMI mediante el uso de placas Sensititre^R DKVP	61
5. EXTRACCIÓN DE ADN	61
5.1. ADN total	61
5.2. ADN plasmídico	62
6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	64
7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA CON CORRIENTE CONTINUA	65
8. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ESTAFILOCOCOS	66
9. TIPADO MOLECULAR	67
9.1. Tipado del SCC_{mec}	67
9.2. Tipado de la región polimórfica del gen <i>spa</i>	70
9.3. Tipado del locus <i>agr</i>	71
9.4. Tipado según Multilocus Sequence Typing (MLST)	72
9.5. Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)	74
10. TIPADO DE PLÁSMIDOS	76
11. DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA	79
12. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA	91
13. HIBRIDACIÓN (SOUTHERN BLOT)	96
14. TRANSFERENCIA GÉNICA	100
14.1. Conjugación	100
14.2. Transformación	101
15. CARACTERIZACIÓN DE ENTORNOS GENÉTICOS	103
15.1. Mapeo por PCR	103
15.2. PCR inversa y secuenciación	106

15.3. Digestión y ligación	107
16. SECUENCIACIÓN	108

RESULTADOS

1. CASOS CLÍNICOS CAUSADOS POR CEPAS DE SARM CC398 EN PACIENTES CON RELACIÓN LABORAL CON GANADO PORCINO.....	113
1.1. Estudio sobre la dinámica de colonización en personas en contacto con animales	133
2. PREVALENCIA DE SARM EN MUESTRAS ALIMENTARIAS DE ORIGEN ANIMAL	139
3. PREVALENCIA DE SARM Y SARM EN MUESTRAS NASALES DE VOLUNTARIOS SANOS	142
4. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE SARM DE ORIGEN HOSPITALARIO.....	148
4.1. Cepas SARM clínicas no seleccionadas	148
4.2. Cepas SARM seleccionadas a partir de su fenotipo de resistencia a tetraciclina.....	156
5. MECANISMOS DE RESISTENCIA INUSUALES EN CEPAS SARM CC398 Y OTRAS CEPAS DE <i>Staphylococcus spp</i>	162
5.1. Cepas portadoras del gen <i>lnu(A)</i>	163
5.2. Cepas portadoras del gen <i>lnu(B)</i>	166
5.3. Cepas portadoras del gen <i>vga(A)</i>	169
5.4. Cepas portadoras del gen <i>vga(A)</i> -variante	174
5.5. Cepas portadoras del gen <i>cfr</i>	176
6. TIPADO Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> DE ORIGEN HUMANO, ANIMAL Y ALIMENTARIO	180
 DISCUSIÓN.....	 197
 CONCLUSIONES.....	 231
CONCLUSIONS	233
 REFERENCIAS	 237
 ANEXO	 279

ABREVIATURAS

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ADNr Ácido Desoxirribonucleico ribosómico

agr accessory gene regulator (gen regulador accesorio)

AIP Péptido Autoinductor

Ala/A Alanina

AMP Ampicilina

Arg/R Arginina

ARNm Ácido Ribonucleico mensajero

ARNr Ácido Ribonucleico ribosómico

ARNt Ácido ribonucleico transferente

Asn/N Asparragina

Asp/D Ácido aspártico

atts sitio de integración en el cromosoma

BD Becton Dickinson (casa comercial)

BHI Brain Heart Infusion (medio de cultivo)

CA-SFM Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie

CC Complejo Clonal

CDS Coding Sequences (secuencia codificante)

CHL Cloranfenicol

CIP/CP Ciprofloxacina

CLI/CL Clindamicina

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

DHFR Enzima dihidrofolato reductasa

DMF Dimetilformamida

DNasa Enzima desoxirribonucleasa

dNTPs Desoxinucleótidos

EARSS Sistema de Vigilancia Europeo de Resistencias

EDTA Ácido Etilendiaminotetraacético

EEUU Estados Unidos

EGMs/MGEs Elementos Genéticos Móviles

EPOC Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERI Eritromicina

ETA Exfoliatina A

ETB Exfoliatina B

ETC Exfoliatina C

ETD Exfoliatina D

FE-G Factor de Elongación G
FOX Cefoxitina
FUS Ácido fusídico
GC Guanina y Citosina
GEN/GE Gentamicina
Gln/Q Glutamina
Glu/E Ácido glutámico
Gly/G Glicina
His/H Histidina
Ile/I Isoleucina
IPPB infecciones de piel y partes blandas
IS Secuencias de Inserción
KAN/KN Kanamicina de alta carga
kb kilobases
L Fenotipo de resistencia a Lincosamidas
L^R-M^S Fenotipo de resistencia a Lincosamidas y sensibilidad a Macrólidos
LB Luria-Bertani (medio de cultivo)
Leu/L Leucina
LEV Levofloxacina
LIN/LI Lincomicina
LPV/PVL Leucocidina de Panton-Valentine
LS_A Fenotipo de resistencia a Lincosamidas y Estreptograminas del grupo A
Lys/K Lisina
LZD Linezolid
M Molar
Met/M Metionina
MH Mueller-Hinton (medio de cultivo)
min minute
MLS Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas
MLS_B Fenotipo de resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B
MLST Multilocus Sequence Typing
mm milímetro
mM milimolar
MOPS 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MS Fenotipo de resistencia a Macrólidos y Estreptograminas B
MSA Mannitol Salt Agar (medio de cultivo)
MUP Mupirocina

NBT/BCIP Cloruro de tetrazolio nitro-azul/Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

NCBI National Center for Biotechnology Information (centro nacional de información biotecnológica)

ORSAB Oxacillin Resistance Screening Agar Base (medio de cultivo)

OXA Oxacilina

pb pares de bases

PBP Penicillin Binding Protein (proteína de unión a penicilina)

PBS Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)

PCR Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PEN Penicilina

PFGE Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en campo pulsante)

Phe/F Fenilalanina

Pro/P Prolina

PTSAg Pyrogenic toxin superantigens (Toxinas pirogénicas superantígenos)

QRDR Quinolone Resistance Determining Region (Región Determinante de Resistencia a Quinolona)

r.p.m. revoluciones por minuto

Rep Proteína de inicio de la replicación

RI Repeticiones invertidas

RLFP Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de fragmentos de restricción)

RM resistentes a meticilina

S_A Fenotipo de resistencia a Estreptograminas del grupo A

SaPIs Islas de Patogenicidad Estafilocócicas

SARM/MRSA *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

SARM-AC/CA-MRSA *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de adquisición comunitaria

SARM-AG/LA-MRSA *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina asociado a ganado

SARM-AH/HA-MRSA *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de adquisición hospitalaria

SARME/EMRSA *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina epidémico

SASM/MSSA *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina

S_B Fenotipo de resistencia a Estreptograminas del grupo B

SCC Casete Cromosómico Estafilocócico

SCC_{mec} Casete Cromosómico Estafilocócico del gen *mecA*

SCN *Staphylococcus coagulasa* negativos

SCRM/MRSC *S. sciuri* resistente a meticilina

SDS Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato sódico)

SE Enterotoxinas Estafilocócicas
seg segundos
Ser/S Serina
SERM/MRSE *S. epidermidis* resistente a meticilina
SESM/MSSE *S. epidermidis* sensible a meticilina
SLV Single Locus Variant (variante única de locus)
SMX Sulfametoxazol
spa *Staphylococcus* protein A gene (gen de la proteína A de *Staphylococcus*)
spp especie
SSC Saline Sodium Citrate (Tampón salino de citrato de sodio)
SST Síndrome de Shock Tóxico
ST Sequence Type (MLST) (secuencia tipo)
STR/ST Estreptomicina
SU Secuencia Única
SXT Trimetoprim-sulfametoxazol
TBE Tris-Bórico-EDTA (tampón para electroforesis)
TE Tris-EDTA
TEC Teicoplanina
TET/TE Tetraciclina
Thr/T Treonina
TIA/TI Tiamulina
TMP Trimetoprim
Tn Transposones
Tnp Transposasa
TOB/TO Tobramicina
TSB Tryptic Soy Broth (medio de cultivo)
TSST Toxina del Síndrome del Shock Tóxico
Tyr/Y Tirosina
U Unidades de enzima
UCI Unidad de Cuidados Intensivos
V Voltios
V/cm² Voltios por centímetro cuadrado
Val/V Valina
VAN Vancomicina
VIR Virginiamicina

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.-** Clases de complejo *mec* de *S. aureus* (Deurenberg et al., 2008).
- Tabla 2.-** Tipos de SCC*mec* de *S. aureus*.
- Tabla 3.-** Genes de resistencia localizados en EGMs dentro del SCC*mec*.
- Tabla 4.-** Ventajas y desventajas de las técnicas de tipado molecular de SARM.
- Tabla 5.-** Diferencias entre SARM-AH y SARM-AC.
- Tabla 6.-** Complejos clonales asociados a animales y las especies en las cuales han sido encontradas.
- Tabla 7.-** Clasificación de las toxinas más conocidas de *S. aureus*.
- Tabla 8.-** Antibióticos, lugares de acción, mecanismos de resistencia y localización de genes de resistencia en *Staphylococcus* spp.
- Tabla 9.-** Factores de virulencia de *S. aureus* codificados por EGMs.
- Tabla 10.-** Cepas de *S. aureus* aisladas de las muestras clínicas y de las muestras nasales de los pacientes y de sus familiares o convivientes en los 7 casos clínicos estudiados.
- Tabla 11.-** Cepas SARM nasales aisladas en el estudio de dinámica de la colonización.
- Tabla 12.-** Cepas de *Staphylococcus* spp. incluidas en este estudio por presentar el fenotipo de resistencia de lincosamidas y sensibilidad a macrólidos.
- Tabla 13.-** Concentración de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por el CLSI para *Staphylococcus* spp.
- Tabla 14.-** Concentración 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 15.-** Concentración de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por Oliveira et al., 2007 para el estudio de sensibilidad a mupirocina en *Staphylococcus* spp.
- Tabla 16.-** Criterios para los rangos de resistencia (R), resistencia intermedia (I) y sensibilidad (S) utilizados en este estudio.
- Tabla 17.-** Reactivos utilizados en la técnica de PCR para un volumen final de 50 µL con la enzima BioTaq DNA polimerasa (Bioline).
- Tabla 18.-** Reactivos utilizados en la técnica de PCR para un volumen final de 50 µL con Taq-Takara DNA Polimerasa (Takara).
- Tabla 19.-** Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para la identificación de SARM.
- Tabla 20.-** Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para la identificación de otras especies de *Staphylococcus* spp. y condiciones de amplificación.
- Tabla 21.-** Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para la identificación del Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) y condiciones de amplificación.
- Tabla 22.-** Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para el tipado del gen *spa* y condiciones de amplificación.

Tabla 23.- Secuencia nucleotídica de cebadores empleados para el tipado de *agr* y condiciones de amplificación.

Tabla 24.- Secuencia de cebadores empleados para el MLST de *S. aureus*.

Tabla 25.- Secuencia de cebadores empleados para el MLST de *S. epidermidis*.

Tabla 26.- Cebadores empleados en el estudio de clasificación de plásmidos: familia *rep*, plásmido de referencia, tamaño, temperatura de hibridación de cebadores, secuencia de los cebadores y referencia.

Tabla 27.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.

Tabla 28.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

Tabla 29.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos.

Tabla 30.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a trimetoprim.

Tabla 31.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a fenicoles.

Tabla 32.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *grlA* y *gyrA*.

Tabla 33.- Secuencia nucleotídica 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 34.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *mupA* e *ileS*.

Tabla 35.- Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *fusa*, *fusB* y *fusC*.

Tabla 36.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados en las PCRs simples para la amplificación de genes codificantes de factores de virulencia.

Tabla 37.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados en las tres PCRs múltiples para la amplificación de los genes codificantes de las 18 entorotoxinas.

Tabla 38.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección del operón *ica* y condiciones

Tabla 39.- Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados para la detección del gen *cna*.

Tabla 40.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR para el estudio de los entornos genéticos del gen *lnu(B)*.

Tabla 41.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR para el estudio de los entornos genéticos del gen *vga(A)* y del gen *vga(A)*-variante.

Tabla 42.- Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR para el estudio de los entornos genéticos del gen *cfr*.

Tabla 43.- Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para la PCR inversa del gen *lnu(A)*.

Tabla 44.- Secuencia nucleotídica de los cebadores adicionales utilizados para la secuenciación de entornos genéticos.

Tabla 45.- Colonización por SARM detectada en los animales de las 6 explotaciones porcinas relacionadas con los casos clínicos 1-4, 6 y 7.

Tabla 46.- Características de las 8 cepas de origen humano aisladas a partir de la lesión de la paciente del caso clínico 1 y de las muestras nasales de ella y de su familia.

Tabla 47.- Características de las 8 cepas SARM aisladas a partir de las muestras nasales de los cerdos de la granja relacionada con el caso clínico 1.

Tabla 48.- Características de las 12 cepas de origen humano aisladas a partir de las lesiones del paciente del caso clínico 2 y de sus muestras nasales.

Tabla 49.- Características de las 11 cepas SARM aisladas a partir de las muestras nasales de los cerdos de la granja relacionada con el caso clínico 2.

Tabla 50.- Características de las 7 cepas de origen humano aisladas a partir de la lesión de la paciente del caso clínico 3 y de las muestras nasales de ella y de su familia.

Tabla 51.- Características de las cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina aisladas a partir de los cerdos de la granja relacionada con el caso clínico 3.

Tabla 52.- Características de las 17 cepas de origen humano aisladas a partir de las lesiones del paciente del caso clínico 4 y de las muestras nasales de él y de sus familiares.

Tabla 53.- Características de las cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina aisladas a partir de los cerdos sanos de las granjas relacionadas con el caso clínico 4.

Tabla 54.- Características de las 2 cepas de origen humano aisladas a partir del caso clínico 5.

Tabla 55.- Características de las 13 cepas de origen humano y animal aisladas a partir del caso clínico 6.

Tabla 56.- Características de las 13 cepas de origen humano aisladas a partir del paciente del caso 7 y de las muestras nasales de él y de su hijo.

Tabla 57.- Cepas SARM obtenidas a partir de las muestras nasales de la paciente y sus familiares antes y después del tratamiento con mupirocina.

Tabla 58.- Características de las cepas SARM aisladas a partir de las muestras nasales de la paciente y sus familiares tras el tratamiento con mupirocina.

Tabla 59.- Prevalencia de cepas de SARM según el origen de las muestras.

Tabla 60.- Características de las cepas de SARM aisladas a partir de las muestras alimentarias de origen animal.

Tabla 61.- Valores de CMI obtenidos en las cepas de SARM aisladas a partir de las muestras alimentarias de origen animal.

Tabla 62.- Complejos Clonales y Secuencias Tipo detectadas en las cepas *tst* positivas y sus variaciones alélicas.

Tabla 63.- Características de las 53 cepas de *S. aureus* aisladas a partir de las muestras nasales de voluntarios sanos.

Tabla 64.- Genes codificantes de los factores de virulencia PVL, TSST, toxinas exfoliativas y combinación de enterotoxinas identificadas en las 53 cepas de *S. aureus*.

Tabla 65.- Perfiles de resistencia, genes de resistencia, CCs y tipos de *spa* de las cepas SARM estudiadas^a.

Tabla 66.- Combinación de los genes de virulencia, CCs y tipos de *spa* de las 204 cepas SARM estudiadas según el año de aislamiento.

Tabla 67.- Tipado molecular de las 52 cepas SARM resistentes a tetraciclina aisladas en el Hosp. Miguel Servet de Zaragoza en 2009-2010.

Tabla 68.- Fenotipo y genotipo de resistencia de las 52 cepas SARM resistentes a tetraciclina y su relación con los complejos clonales y los tipos de *spa* detectados.

Tabla 69.- Procedencia de las cepas resistentes a lincomicina y sensibles a eritromicina en función del gen de resistencia detectado.

Tabla 70.- Características de las cuatro cepas de estafilococos portadoras del gen *lnu(A)*.

Tabla 71.- Valores de CMI de las 4 cepas portadoras del gen *lnu(A)*, de sus transformantes y de la cepa receptora RN4220.

Tabla 72.- Características de las tres cepas de estafilococos portadoras del gen *lnu(B)*.

Tabla 73.- Valores de CMI de las tres cepas portadoras del gen *lnu(B)*.

Tabla 74.- Características de las ocho cepas de estafilococos portadoras del gen *vga(A)*.

Tabla 75.- Valores de CMI de las ocho cepas de estafilococos portadoras del gen *vga(A)*, de los transformantes obtenidos y de la cepa receptora (RN4220).

Tabla 76.- Valores de CMI y mecanismos de resistencia detectados en las tres cepas SERM, en la cepa receptora (ATCC 29213) y en el transconjugante.

Tabla 77.- Las 112 secuencias de genes *rep* de *S. aureus* con el nombre del gen/ORFs, nombre del plásmido y tamaño, número de acceso del GenBank, posición y tamaño y número de la familia *rep* a la cual pertenece.

Tabla 78.- Familias *rep* y secuencias únicas detectadas en la 92 cepas de *S. aureus* según su resistencia a meticilina, su origen y su complejo clonal.

Tabla 79.- Contenido plasmídico y relación entre plásmidos y genes de resistencia de las 18 cepas SARM seleccionadas.

Tabla 80.- Características y resultado obtenidos en las 92 cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio de plásmidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Representación de las partes fundamentales del SCC*mec*: complejo *mec*, *ccr* y regiones J.

Figura 2.- Organización del locus *agr*.

Figura 3.- Porcentaje de SARM aislados de hemocultivos durante el año 2010.

Figura 4.- Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Figura 5.- Dianas de los agentes antibióticos usados comúnmente contra *S. aureus*.

Figura 6.- Estructura de una secuencia de inserción.

Figura 7.- Estructura de un transposón de la familia Tn3.

Figura 8.- Estructura de un transposón compuesto.

Figura 9.- Foto de la izquierda: lesión cutánea en la barbilla de la paciente; foto de la derecha: dos cepas de SARM con diferente morfología.

Figura 10.- Lesiones cutáneas del paciente: cuero cabelludo, conducto auditivo, mano.

Figura 11.- Imagen radiográfica de tórax del paciente correspondiente al quinto caso clínico.

Figura 12. Distribución de las muestras recogidas en función de su origen animal.

Figura 13.- Origen de las cepas de SARM obtenidas del Hospital San Pedro.

Figura 14.- Origen de las cepas SARM-TET^R obtenidas del Hosp. Univ. Miguel Servet de Zaragoza.

Figura 15.- Método de aislamiento de SARM y SASM.

Figura 16.- Placa de DNAsa tras la adición de ácido clorhídrico. La cepa de la parte superior es positiva y la cepa de la parte inferior negativa.

Figura 17.- Cepa con resistencia inducible a la clindamicina (D-test positivo).

Figura 18.- 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 Shopsis et al., 2003).

Figura 19.- 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).

Figura 20.- Dibujo esquematizado del montaje para la transferencia a la membrana.

Figura 21.- Distribución del TSB con *S. aureus* RN4220 para la transformación.

Figura 22.- Resuspensión con sacarosa en la transformación.

Figura 23.- Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del paciente y de algunos de los animales del caso clínico 2.

Figura 24. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del paciente, su hermano y de los animales del caso clínico 6.

Figura 25. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del paciente y de los animales del caso clínico 7

Figura 26. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del caso clínico número 1.

Figura 27.- CC-SCC*mec-agr* y tipos de *spa* de las cepas de ambos periodos.

Figura 28.- Origen de las cepas y CCs identificados en las cepas del 2001 y del 2009.

Figura 29.- Porcentajes de resistencia detectados en las cepas de SARM de cada periodo.

Figura 30.- Estructura completa del plásmido pLNU1 detectado en las cepas C1841, C4128 y C2376, del nuevo plásmido pUR5425 detectado en la cepa C5425 y del plásmido pLNU4.

Figura 31.- Patrones de PFGE de las cepas de SASM del Hospital General Universitario de Elche. Línea 1, C2828; línea 2, C2829. M: marcador de peso molecular λ Ladder.

Figura 32.- Estructura del nuevo entorno genético del gen *lnu*(B) detectado en las cepas C2944, C2828 y C2829 y la estructura del plásmido ya descrito pEF418.

Figura 33.- Estructura completa del plásmido pVGA detectado en las cepas C2931 y C2362 y de los plásmidos pUR2355 y pUR4128 descrito en este estudio e identificado en las cepas C2355, C5250, C2665 y C4128.

Figura 34.- Estructura completa del plásmido pSE-12228-06 y de los nuevos plásmidos pUR3036 y pUR3937 descritos en este estudio e identificados en las cepas C3036 y C3937.

Figura 35. Alineamiento de las secuencias proteicas de Vga(A) codificadas por los genes *vga*(A) de los plásmidos pVGA, pCPS32, pUR2355, pUR4128, pUR3036 y pUR3937.

Figura 36.- Patrones de PFGE de las cepas de SARM obtenidas a partir de la paciente.

Figura 37.- Estructura del Tn5406 detectado en la cepa C3898. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección.

Figura 38.- Cromatograma en el que se observa doble pico en la posición 2561. La mutación aparece marcada.

Figura 39.- Estructura del plásmido pSCFS7. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección.

Figura 40.- Imágenes de las hibridaciones realizadas para establecer la localización del gen *cfr*.

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria que puede encontrarse en la piel, nariz o boca de personas sanas sin causar enfermedad. Sin embargo, *S. aureus* es, al mismo tiempo, un patógeno importante que puede estar implicado en procesos infecciosos o en toxiinfecciones alimentarias. En los últimos años existe una gran preocupación por el aumento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), que suponen un gran problema terapéutico ya que implican resistencia a casi todos los antibióticos β -lactámicos. A partir del año 2005 se ha descrito la diseminación de clones de SARM asociados a animales de granja, correspondientes a la línea genética CC398, y su posterior transferencia a humanos, como agente colonizador e infeccioso.

En este estudio se caracterizaron un total de 7 casos clínicos causados por cepas CC398 en un hospital español. Cuatro de los pacientes tenían relación laboral directa con cerdos, dos convivían con familiares que trabajaban en una granja y en uno de los pacientes no existía relación con animales. Además, en 6 de los casos, algún familiar o conviviente resultó ser portador nasal de cepas SARM CC398. Con el fin de establecer la posible transmisión de cepas CC398 del animal al hombre, se estudiaron las explotaciones porcinas relacionadas con 6 de los casos clínicos y, en 4 de estos casos, esta transmisión se vio confirmada al hallarse cepas con características similares en los cerdos y en los pacientes o familiares. Estas cepas fueron, en general, poco virulentas pero mostraron en la mayoría de los casos un patrón de resistencia múltiple a antibióticos. Se analizó, también, la dinámica de colonización nasal en personas en contacto con animales. Para ello, se eligió uno de los casos clínicos y se tomaron varias tomas de muestras tras la descolonización con mupirocina de paciente y familiares. Se observó como el tratamiento con mupirocina parece tener mayor efectividad en personas en contacto esporádico con animales o en contacto con humanos colonizados por SARM que en personas con relación directa con animales colonizados.

Se determinó la prevalencia de SARM en muestras de alimentos y en muestras nasales de personas sanas y se caracterizaron cepas de origen clínico con el objetivo de conocer más sobre la epidemiología de este microorganismo y saber si cepas de la variante CC398 estaban presentes. Se detectó una prevalencia baja de SARM en muestras cárnicas (1.6%) y, según los resultados de tipado molecular obtenidos, las cepas aisladas fueron posiblemente de origen humano (CC5 y CC217) y de origen animal (CC398). En individuos sanos y sin factores de riesgo se encontró una tasa de

colonización por SASM moderada (19%) y por SARM muy baja (0.4%). Se identificó una gran diversidad genética entre las cepas SASM y la mayor parte de las cepas fueron sensibles a los antibióticos testados. No obstante, fue preocupante la detección de cepas portadoras de los genes de virulencia *tst* y *eta*. Se hallaron, además, cepas SASM CC398 y CC97 en personas sin contacto con animales. Por otro lado, se llevó a cabo un estudio comparativo entre cepas clínicas de SARM aisladas en un hospital en dos periodos separados entre sí por 8 años (2001 y 2009). Se observó que la línea genética CC5-t067, la cual se asoció con resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos, continúa siendo la más predominante a nivel hospitalario en nuestro país. Se detectó, además, un aumento de la prevalencia de cepas CC8 e incluso se identificaron dos cepas LPV positivas. El nivel de resistencia permaneció más o menos constante con una ligera tendencia a la baja en el segundo periodo y se identificó la emergencia de resistencia a mupirocina. Entre las cepas clínicas incluidas en este estudio no se detectaron cepas pertenecientes a la variante CC398. Una de las características de SARM CC398 es que la mayor parte de las cepas presentan resistencia a tetraciclina. Por ello, se decidió estudiar genéticamente 52 cepas clínicas SARM resistentes a tetraciclina aisladas en un hospital en los años 2009 y 2010 con el fin de establecer si la resistencia a este antibiótico podría ser un buen marcador para identificar cepas CC398. La mayor parte de las cepas presentaron tipos de *spa* asociados al CC398 (67.3%) pero también se identificaron cepas pertenecientes a los complejos clonales CC1 (11.5%), CC5 (11.5%) y CC8 (9.6%).

Se estudiaron, también, mecanismos inusuales de resistencia de cepas SARM CC398 y de otras cepas de *Staphylococcus* spp. que presentaban el fenotipo disociado lincosamidas resistente-macrólidos sensible. Se detectaron diferentes genes que se encontraban vehiculizados por pequeños plásmidos [*lnu(A)*], plásmidos de gran tamaño [*lnu(B)*], plásmidos movilizables [*vga(A)*], plásmidos conjugativos [*cfr*] y transposones [*vga(A)*-variante]. En algunos casos, se detectaron plásmidos (pUR2355, pUR4128, pUR3036, pUR3937, pUR5425) o entornos genéticos nuevos y se estableció una relación entre estos genes y algunas líneas genéticas asociadas a animales (CC9 y CC398).

Para profundizar en el estudio de EGMs se quiso estudiar el contenido plasmídico de una colección de cepas de *S. aureus*. Para ello se amplió un sistema previamente desarrollado para bacterias Gram positivas estableciéndose 15 familias *rep*

y 10 secuencias únicas. La mayoría de las cepas estudiadas presentó un número elevado de plásmidos de tamaños muy diferentes y se corroboró que los plásmidos son estructuras altamente dinámicas capaces de transmitirse entre diferentes géneros y especies.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a bacteria frequently found on the skin, on the nose and on the mouth without causing disease. However, it is also an important pathogen that can be involved in infectious processes or food poisoning. Recently, there is a high concern about the increase of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains. These strains are resistant to all β -lactams, and this fact leads to a serious therapeutic problem. Since 2005, a livestock-associated MRSA belonging to CC398 has been spreading. This clonal lineage has been detected as infectious and colonizer agent in animals, mainly farm animals, but also in humans.

In this study, a total of 7 clinical cases detected in a Spanish hospital and caused by MRSA CC398 were characterized. Four of the patients had a working relationship with animals, two patients lived with some farm worker and one patient did not have contact with animals. Moreover, in six cases, some relatives were nasal carriage of MRSA CC398. In order to establish the possible animal-to-human transmission of CC398 strains, pig farms related to 6 of the cases were analyzed. In four of them, this transmission was confirmed due to the fact that similar strains were obtained from animal and human samples. MRSA CC398 isolated strains did not present any virulence tested genes and usually showed a multiresistance phenotype. The dynamic of MRSA nasal colonization was also studied. For this, one of the cases was chosen and several samples of patient and relatives were taken on different occasions after mupirocin treatment. The efficacy of nasal MRSA decolonization seemed to be higher in people with sporadic contact with animals or contact with MRSA colonized humans than people with close contact with colonized animals.

Alternatively, with the purpose to know more about the epidemiology of this microorganism and to detect the possible presence of MRSA CC398 strains, the prevalence of MRSA in food and nasal samples of healthy people was studied as well as clinical MRSA strains were characterized. A low prevalence of MRSA (1.6%) was identified in meat samples and molecular typing results suggested that these strains

could be from both human (CC5 y CC217) and animal origin (CC398). A moderate frequency of MSSA (19%) and a low prevalence of MRSA (0.4%) were detected in healthy people in this study. A high genetic diversity was found among MSSA strains and most of them were susceptible to all tested antimicrobials. Nevertheless, *tst*- and *eta*-positive strains were isolated. Moreover, MSSA CC398 and CC97 were detected in people without contact with animals. A comparative study among clinical MRSA strains of a Spanish hospital isolated in two periods distant in time was carried out. CC5-t067 lineage was still predominant in our country and it was associated with resistance to quinolones, aminoglycosides and in a lesser extent to macrolides. A possible emergence of CC8 is identified in the second period with two PVL positive MRSA strains. The level of resistance among MRSA remains more or less constant in both periods although it seems that there could be a slight downward trend in the second period in which appeared mupirocin resistance. No MRSA CC398 was identified in these strains. Since MRSA CC398 normally presents resistance to tetracycline, 52 tetracycline resistance clinical MRSA isolates were studied. These strains were isolated in a Spanish hospital in 2009 and 2010. The aim was to determine whether tetracycline resistance could be a good marker to detect MRSA CC398. Most of 52 strains presented *spa*-types associated with CC398 (67.3%) although strains belonging to other CCs were identified: CC1 (11.5%), CC5 (11.5%) y CC8 (9.6%).

Resistance mechanisms involved in the unusual phenotype lincosamides resistance and macrolides susceptibility was analyzed in MRSA CC398 strains and other *Staphylococcus* spp. strains. Different genes located on genetic mobile elements were detected: *lnu(A)* (in small plasmids), *lnu(B)* (in large plasmids), *vga(A)* (in mobilizable plasmids), *cfr* (in conjugative plasmids) and *vga(A)*-variant (in transposon). In some cases, novel plasmids (pUR2355, pUR4128, pUR3036, pUR3937, pUR5425) or genetic environments were identified and it seemed to be a relation between these genes and some animal clonal lineages as CC9 and CC398.

In order to know more about genetic mobile elements a study about plasmid content of *S. aureus* strains was performed. An expanding of a plasmid classification system for Gram-positive bacteria was carried out and 15 *rep*-families and 10 unique sequences were established. Most of the strains presented a high number of plasmids from different sizes. In this study, it was confirmed that plasmids are dynamic structures and that plasmids are able to be transmitted between different genera and species.

INTRODUCCIÓN

1. *Staphylococcus aureus* COMO AGENTE PATÓGENO OPORTUNISTA

S. aureus es un patógeno oportunista que se encuentra habitualmente formando parte de la microbiota normal de la piel, nariz, boca, faringe, tracto intestinal o vagina, sin causar enfermedades, siendo la localización más frecuente la colonización nasal. Aproximadamente un tercio de la población humana sana está colonizada de forma intermitente y otro tercio es portadora nasal continua de *S. aureus* (Gordon et al., 2008). También se encuentra, como comensal o como causante de infecciones, en animales de distintas especies (mamíferos y aves principalmente).

La eliminación de portadores nasales puede reducir la incidencia de infecciones por *S. aureus*, siendo la mupirocina el antibiótico tópico de elección para la erradicación de portadores (Doebbeling et al., 1993). Sin embargo, se ha comprobado como su uso repetido y prolongado puede conducir a la resistencia a este antibiótico (Miller et al., 1996).

La patogenia de *S. aureus* se caracteriza por su posible capacidad para producir determinadas enzimas y toxinas que son considerados factores de virulencia, ya que favorecen la invasión celular, la degradación de células del sistema inmunitario, la alteración de tejidos, la multiplicación de la bacteria e intervienen en la aparición de síntomas en los diferentes cuadros clínicos. Entre los determinantes de virulencia se encuentran componentes de la pared celular (cápsula mucoide polisacáridica, adhesinas, proteína A, ácidos teicoicos), enzimas (coagulasa, hialuronidasa, catalasa, termonucleasas) y diferentes toxinas (Gordon, 2008). Gracias a la producción de estos factores de virulencia *S. aureus* es capaz de producir lesiones superficiales del tejido cutáneo y subcutáneo como furúnculos, orzuelos o impétigo. Sin embargo, también es capaz de provocar un amplio espectro de cuadros infecciosos y toxigénicos, estando implicado en brotes o epidemias hospitalarias y comunitarias. El mayor riesgo tiene lugar en personas debilitadas ya sea por una enfermedad crónica, por inmunodepresión, o por una herida traumática o quemadura, entre otros. En estos casos se favorece la penetración del microorganismo hasta otros tejidos pudiendo derivar en patologías más graves como neumonía, meningitis, miocarditis, pericarditis, endocarditis, abscesos o bacteriemias. Además, este microorganismo se relaciona con intoxicaciones alimentarias pero, en este caso, las responsables del cuadro clínico son las enterotoxinas producidas durante el crecimiento de la bacteria en el alimento.

2. *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)

S. aureus presenta una gran capacidad para adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos. De esta forma, en la década de los 40, se introdujo la penicilina como tratamiento de las infecciones estafilocócicas y tan solo un año después empezaron a detectarse cepas de *S. aureus* resistentes a este antibiótico. Esta resistencia es debida a la acción de penicilinasas (codificadas por el gen *blaZ*), enzimas β -lactamasas capaces de hidrolizar la penicilina. Actualmente, más del 90% de las cepas de *S. aureus* presentan este mecanismo de resistencia.

Debido a la aparición y frecuencia de estas enzimas se buscaron nuevos antibióticos capaces de combatir las infecciones producidas por *S. aureus*. Surgió así la meticilina o dimetoxibencilpenicilina que mediante la adición de radicales en el ácido 6-amino-penicilánico es capaz de escapar de la acción de las β -lactamasas. Este antibiótico 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 test de sensibilidad debido a su mayor estabilidad. Sin embargo, pronto aparecieron cepas de *S. aureus* resistentes a estas sustancias (Jevons, 1961) que fueron denominadas cepas resistentes a meticilina (SARM) y que son capaces de sintetizar una PBP (Penicillin Binding Protein) modificada (PBP2a) que presenta poca afinidad por los antibióticos β -lactámicos (Hartman et al. 1981; Hayes et al., 1981). El gen codificante de esta PBP2a es el gen *mecA* el cual se encuentra dentro de un casete cromosómico estafilocócico denominado SCC*mec* lo que permite la diseminación de este mecanismo de resistencia. Las cepas de *S. aureus* que contienen el gen *mecA* son resistentes a todos los β -lactámicos con la excepción de dos nuevas cefalosporinas, ceftobiprole y ceftarolina (Cheng et al., 2008; Jacqueline et al., 2009). Esto supone, por tanto, un importante problema terapéutico, al que hay que sumarle la extraordinaria capacidad de los estafilococos para adquirir resistencias a otros antimicrobianos. Hoy en día, SARM es considerado como uno de los patógenos más importantes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo.

3. TIPADO MOLECULAR

Se han desarrollado diferentes técnicas de tipado molecular con el fin de entender la epidemiología de *S. aureus* y especialmente de SARM, conocer los clones predominantes, su especificidad y/o transmisibilidad, y así poder llevar a cabo un mayor control de la diseminación de este microorganismo. Sin embargo, ante la falta de un consenso en el método de tipado óptimo, hoy en día, se opta por la caracterización empleando varias de estas técnicas. A continuación se exponen los fundamentos de algunos de estos métodos de tipado molecular de SARM.

3.1. Tipado del SCC_{mec}

Es una técnica basada en el análisis del polimorfismo asociado al SCC_{mec} que contiene al gen *mecA*. Los principales elementos del SCC_{mec}, así como sus funciones se describen a continuación.

El gen *mecA* codifica la PBP2a y está regulado por dos genes, *mecI* y *mecR1*. 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 de una proteína integral de membrana codificada por el gen *mecR1*, esto induce a una proteasa autocatalítica que inactiva al represor con lo que el operador de *mecA* queda libre expresándose la PBP2a (Zhang et al., 2001). Se han diferenciado distintas clases genéticas del complejo *mec*, que comprenden el gen *mecA*, estos genes reguladores y las secuencias de inserción IS431 e IS1272:

Tabla 1.- Clases de complejo *mec* de *S. aureus* (Deurenberg et al., 2008).

Clase de complejo <i>mec</i>	Estructura
A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>
B	IS431- <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i> -IS1272
C1	IS431 ^a - <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^a
C2	IS431 ^b - <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^b
D	IS431- <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i>
E	<i>blaZ</i> - <i>mecA</i> _{LGA251} - <i>mecR1</i> _{LGA251} - <i>mecI</i> _{LGA251}

^aCon la misma orientación; ^bCon distinta orientación

De esta forma, el gen *mecA* forma parte de una isla genómica conocida como SCC*mec* que está integrada en el cromosoma de *S. aureus*. Aunque el origen del gen *mecA* no está del todo claro, se cree que proviene de la especie *Staphylococcus sciuri* (Wu et al., 2001). 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.

Se han descrito distintos tipos de SCC*mec* en función de las características de los genes *ccr* y de las secuencias adyacentes, de la variabilidad del complejo *mec* y sus genes reguladores y de determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones (Ito et al., 2001). Hasta el momento se conocen 11 tipos de SCC*mec* y diferentes subtipos clasificados en base a la secuencia de las regiones J (junkyard) (http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html).

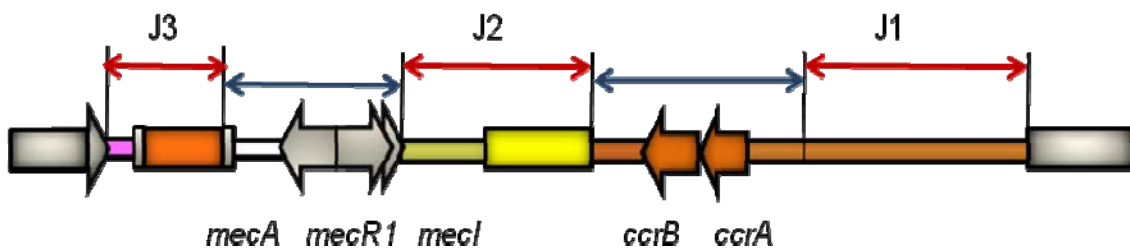


Figura 1. Representación de las partes fundamentales del SCC*mec*: complejo *mec*, *ccr* y regiones J.

Tabla 2.- Tipos de SCC*mec* de *S. aureus*.

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

Se ha observado como el genoma de *S. aureus* se encuentra en constante cambio, adquiriendo genes que permiten a la bacteria desarrollar resistencia a los antibióticos utilizados contra ella. Así, dentro del SCCmec podemos encontrar también genes de resistencia a otros antibióticos no β -lactámicos como aminoglucósidos, eritromicina, clindamicina, rifampicina, tetraciclina o trimetoprim-sulfametoxazol (**Tabla 3**) (Hiramatsu et al., 1999; Li et al., 2011; Turlej et al., 2011).

Tabla 3.- Genes de resistencia localizados en EGMs dentro del SCCmec

EGM	SCCmec	Gen/es	Resistencia
pUB110	I, II, IVa	<i>ble/ant(4')-Ia</i>	Bleomicina/tobramicina
Tn554	II, VIII	<i>erm(A)/spc</i>	Estreptomicina/espectinomicina
pT181	III, V	<i>tet(K)</i>	Tetraciclina
ψ Tn554	III	<i>cad</i>	Cadmio
Tn4001	IV (IVa y IV _{2B&5})	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	Aminoglucósidos

El último tipo de SCCmec descrito hasta el momento (el XI) contiene un nuevo gen *mecA* que hasta la fecha resultaba indetectable por PCR con los oligonucleótidos utilizados por los laboratorios. El SCCmec tipo XI parece estar relacionado con cepas SARM de origen bovino aunque ha sido también detectado en cepas de origen humano (García-Álvarez et al., 2011; Shore et al., 2011). En cualquier caso, todavía existe mucho por descubrir sobre el sistema SCCmec, de hecho, hoy en día existen multitud de cepas con SCCmec no tipables hasta el momento, con SCCmec con dos tipos de *ccr* o con SCCmec que no contienen el gen *mecA* (IWG-SCC, 2009).

3.2. Tipado del locus *agr*

El locus *agr* (accessory gene regulator) fue descrito por primera vez en *S. aureus*, pero se trata de un sistema de regulación global en el género *Staphylococcus*. 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).

El locus *agr* consta de varios genes: *agrB* que codifica una proteína de membrana encargada de la translocación y modificación de AgrD; *agrD* que codifica un octapéptido precursor del AIP; *agrC* codificante de una proteína de membrana receptora de la señal del AIP y *agrA* codificante del regulador de respuesta AgrA que cuando está fosforilado se une al promotor y activa la transcripción.

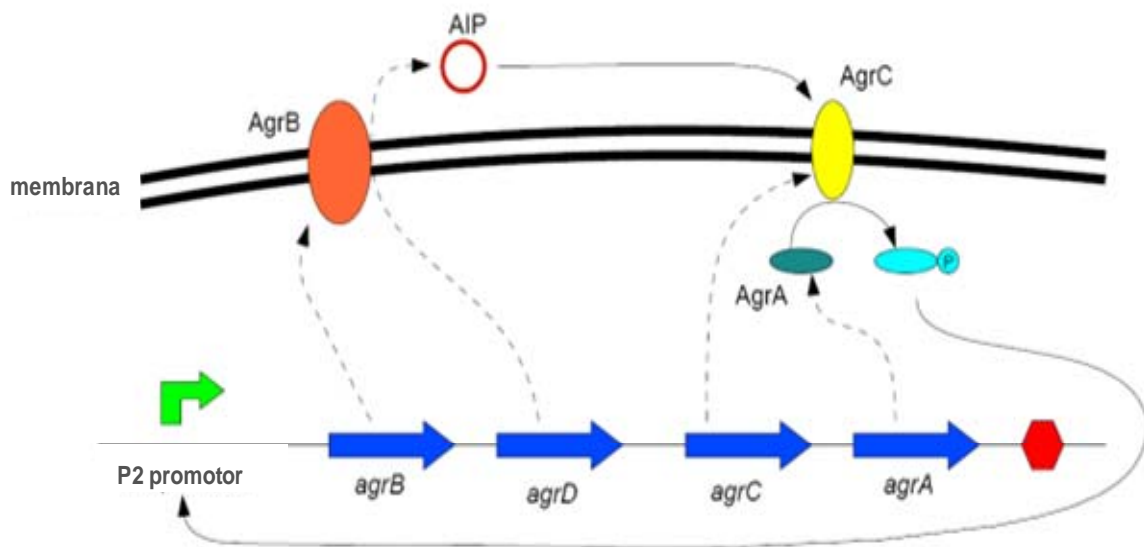


Figura 2. Organización del locus *agr*.

Las cepas de *S. aureus* se pueden clasificar en función del tipo de locus *agr* que presenten, existiendo cuatro tipos para esta especie. Se ha visto como cepas pertenecientes a un mismo grupo pueden activar la respuesta *agr* en otras cepas de ese mismo grupo e inhiben a aquellas que pertenezcan a otro grupo. Se trata de una forma de interferencia entre bacterias (Shopsin et al., 2003).

Se ha sugerido además, que estos grupos de *agr* pueden influir en la capacidad de *S. aureus* para colonizar al huésped compitiendo con otras bacterias incluyendo otras especies de *Staphylococcus*. Esto afecta también a la transmisión entre hospedadores y a la epidemiología de los diferentes clones de *S. aureus* (Shopsin et al., 2003). Además, se ha estudiado cómo la expresión del *agr* parece ser importante durante las etapas tempranas de la infección por *S. aureus* (Traber et al., 2008).

3.3. Tipado por Multilocus Sequence Typing (MLST)

Multilocus Sequence Typing (MLST) es una técnica desarrollada en 1998 (Maiden et al., 1998) que consiste en el análisis de la secuencia nucleotídica de fragmentos internos (unas 500 pb) de ciertos genes “housekeeping” que codifican enzimas metabólicas. Este análisis permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables (Domínguez et al., 2005). En el caso de *S. aureus*, esta técnica se utilizó por primera vez en el año 2000 y los siete genes “housekeeping” utilizados fueron: *arcC* (carbamato quinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *glpF* (glicerol quinasa), *gmk* (guanilato quinasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *tpi* (triosafosfato isomerasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (Enright et al., 2000). La secuencia de estos genes se compara con los alelos conocidos y accesibles en la página web www.mlst.net y el perfil alélico obtenido permite deducir la secuencia tipo (ST) de la cepa. Por último, el algoritmo BURST que se basa en secuencias tipo relacionadas, se usa para definir los diferentes complejos clonales (CCs). Según el modelo más conservado un CC es un conjunto de STs que difieren entre sí en un solo alelo. Esta técnica de tipado también se emplea para otras especies del género *Staphylococcus* como *S. epidermidis* (Thomas et al., 2007).

3.4. Tipado de la región polimórfica del gen *spa*

La técnica del “*spa*-typing” fue desarrollada en 1996 (Frenay et al., 1996), y se basa en la amplificación y posterior secuenciación de una región polimórfica del gen que codifica la proteína A (*spa*). Este gen sufre adiciones y/o pérdidas de los fragmentos repetidos así como mutaciones espontáneas en estas regiones. De esta forma, analizando el número de repeticiones y su variabilidad se pueden asignar distintos tipos (*spa*-types) (Harmsen et al., 2003). Esta técnica resulta de gran interés debido a su rapidez y sencillez (Shopsin et al., 2000). Además, se ha observado una buena correlación, en muchos casos, entre las STs obtenidas por MLST y los tipo de *spa* (Oliveira et al., 2002).

3.5. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

La técnica de PFGE se basa en la generación de fragmentos de restricción de gran tamaño al digerir el ADN de una bacteria con enzimas endonucleasas de baja frecuencia de corte. Los patrones obtenidos para las distintas cepas pueden ser

comparados y permite establecer relaciones genéticas entre ellas. Esta técnica se empleó por primera vez en *S. aureus* en 1995 (Bannerman et al., 1995) y desde entonces es uno de los métodos de tipado más empleados.

Se considera que es la técnica más discriminativa para el estudio de *S. aureus* siendo muy utilizada para el estudio de brotes hospitalarios. La enzima utilizada para la digestión del ADN cromosómico en este caso es *SmaI*. Una vez obtenidos los perfiles electroforéticos de cada aislado, éstos se analizan teniendo en cuenta los criterios de Tenover et al., 1995. Para poder comparar los datos obtenidos mediante esta técnica se requiere de un protocolo y una nomenclatura común. Este objetivo se ha intentado llevar a cabo en múltiples ocasiones dando lugar a la elaboración del “Harmony PFGE protocol” (Murchan et al., 2003).

Sin embargo, en los últimos años está emergiendo una nueva variante genética tipada por MLST como ST398 que resulta no tipable (NT) por PFGE (Voss et al., 2005). Esto se debe a una metilación en las bases adenina y citosina que impide el corte por la enzima *SmaI*. En la actualidad, existen numerosos trabajos en los cuales se está ensayando con otras enzimas como *XmaI*, *ApaI*, *BstZI*, *SacII* o *Cfr9I* con el fin de poder utilizar esta técnica en cepas pertenecientes a la secuencia tipo ST398 (Bosch et al., 2010; Kadlec et al., 2009; Rasschaert et al., 2009).

En la siguiente **Tabla** se presentan las ventajas y desventajas de las distintas técnicas de tipado de SARM descritas (Struelens et al., 2009).

Tabla 4.- Ventajas y desventajas de las técnicas de tipado molecular de SARM.

Técnica	Ventajas	Desventajas
SCC <i>mec</i>	-Relativamente rápida -Fácil comparación entre laboratorios -Nomenclatura estándar	-Errores en su propia clasificación (multitud de cepas no tipables) -Bajo poder discriminatorio (11 tipos) -No correlación perfecta con ST y tipo de <i>spa</i>
<i>agr</i>	-Rápida -Fácil comparación entre laboratorios -Nomenclatura estándar	-Bajo poder discriminatorio (4 tipos)
MLST	-Fácil comparación entre laboratorios -Nomenclatura estándar -Relativo poder discriminatorio (>2300 tipos)	-Bajo rendimiento -Alto coste
<i>spa</i>	-Rápida -Alto rendimiento -Fácil comparación entre laboratorios -Nomenclatura estándar -Bastante poder discriminatorio (>10200 tipos)	-Errores en la clasificación ST
PFGE	-Alto poder discriminatorio (tantos tipos como clones haya)	-Exigencia técnica, lenta -Limitada comparación entre laboratorios -Múltiples nomenclaturas

4. EPIDEMIOLOGÍA DE *S. aureus* RESISTENTE A METICILINA

S. aureus es, por tanto, un importante patógeno que combina la producción de toxinas con una importante capacidad invasiva, a esto hay que añadirle su capacidad para adquirir resistencias a diferentes antibióticos. En los últimos años, se ha producido un dramático incremento de la prevalencia de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, sobre todo a meticilina. La primera cepa de SARM se aisló en un hospital de Reino Unido en 1961 (Jevons, 1961) y el primer brote tuvo lugar en un hospital infantil en 1963 (Stewart et al., 1963). Desde entonces, la prevalencia de cepas SARM ha ido aumentando en todos los hospitales del mundo, detectándose en los años 90 las primeras cepas SARM en pacientes de la comunidad (Gross-Schulman et al., 1998; Udo et al., 1993). De esta forma, la epidemiología de SARM ha sufrido importantes cambios

en los últimos años. En un primer momento, se distinguieron clones asociados a ambientes hospitalarios (SARM-AH) y clones asociados a ambientes comunitarios (SARM-AC), los cuales, a priori, presentaban características diferenciales (Deurenberg et al., 2008). Además, recientemente, se ha observado como están aumentando las infecciones producidas por clones cuyo origen parece estar relacionado con animales de producción (SARM-AG) (Wulf et al., 2008).

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

Desde que se aisló la primera cepa SARM en Reino Unido se ha ido diseminando en el ámbito hospitalario sin restricciones geográficas. Pocos años después surgieron brotes en otros países europeos y durante los años 70 se extendió a Australia, Japón y Estados Unidos. De esta forma este microorganismo llegó a causar un alto porcentaje de las infecciones nosocomiales en todo el mundo (Grundmann et al., 2006). La prevalencia ha variado mucho de unos países a otros y de unos hospitales a otros. En algunos centros hospitalarios, más de la mitad de los aislados de *S. aureus* invasivos eran resistentes a meticilina. A nivel mundial, considerando aquellos países de los que existen datos, nos encontramos con valores bajos (10%) en Canadá y Groenlandia, valores medios (10-25%) en Méjico, Venezuela, en algunos países africanos (Túnez, Marruecos, Costa de Marfil, Camerún y Senegal), en Pakistán y en la India y valores muy elevados (50%) en Estados Unidos, Brasil, Argentina, Chile, Perú, Tailandia, Vietnam y Corea (Stefani et al., 2012). En Europa, según los datos publicados por el Sistema de Vigilancia Europeo de Resistencias (EARSS) (www.earss.rivm.nl) sobre la prevalencia de SARM invasivo, se observa que existe un gradiente de norte a sur. En países del norte como Finlandia, Suecia y Noruega la incidencia es menor (<1%), mientras que en la mayoría de países centro-europeos se encuentran valores medios (10-25%) y en países del sur (Francia, Italia, España, Grecia) se estima un porcentaje de SARM entre el 25 y el 50%. Estas diferencias pueden ser debidas a las distintas políticas de uso de antibióticos, la diferente presión selectiva y los programas de control de la infección. Existe, en la actualidad, muy pocos datos referentes a África y Asia.

Sin embargo, los últimos datos registrados parecen esperanzadores. Según el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) en el 2010 las infecciones invasivas de SARM detectadas en el

sistema de salud de EEUU disminuyeron con respecto a años anteriores (www.cdc.gov/mrsa/). En Europa, la EARSS ha notificado que siete países (Austria, Chipre, Estonia, Francia, Grecia, Irlanda y Reino Unido) han disminuido su prevalencia de SARM invasivo. Sin embargo, cuatro países han aumentado la tasa de SARM (Italia, Hungría, Alemania y Eslovenia) y el porcentaje de SARM es superior al 25% en ocho países (www.rivm.nl/earss/). En un estudio de vigilancia llevado a cabo en Canadá desde 1995 a 2009 se vio un incremento en el número de SARM el cual se estabilizó a partir del 2006 (<http://www.phac-aspc.gc.ca>). No obstante, las tasas siguen siendo elevadas en muchos países por lo que la reducción de la incidencia de este microorganismo sigue siendo una prioridad.

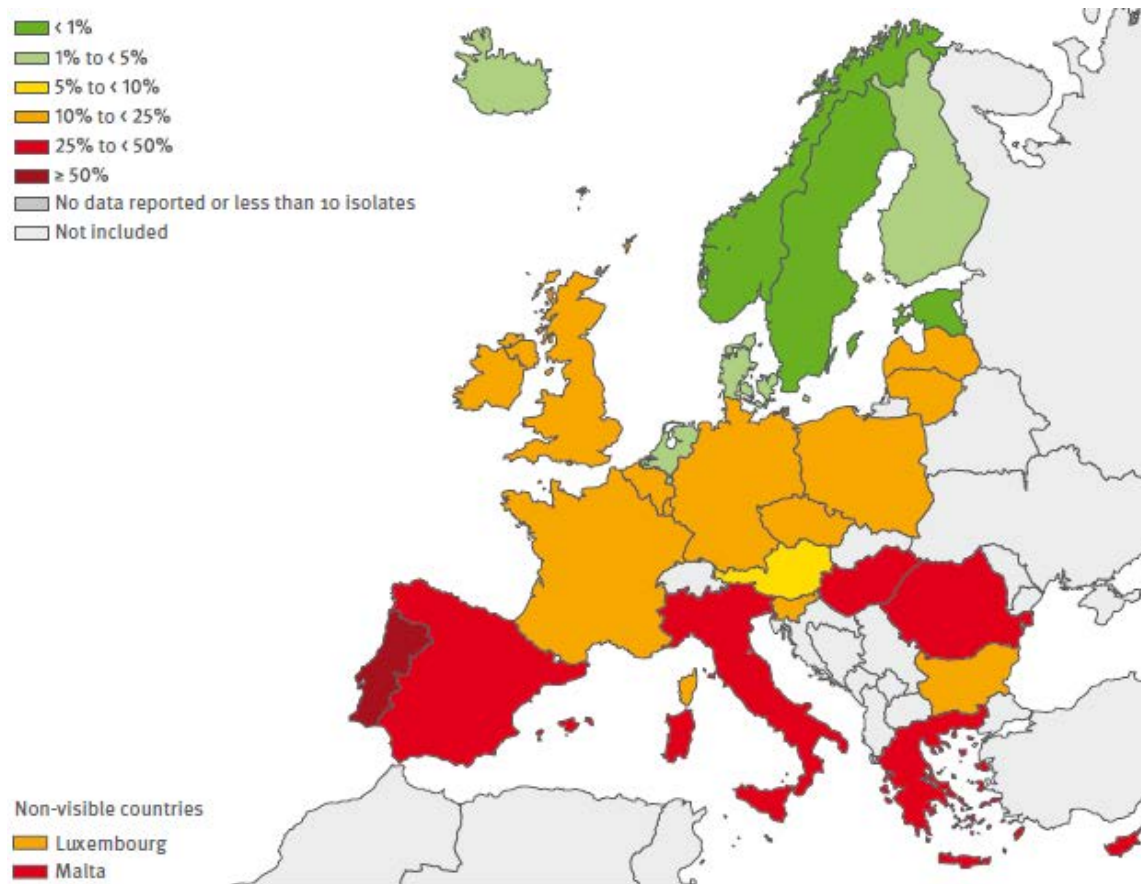


Figura 3. Porcentaje de SARM aislados de hemocultivos durante el año 2010 (EARSS).

Se ha observado como SARM, a diferencia de *S. aureus* sensible a meticilina (SASM), presenta una menor diversidad clonal y en muchos casos existe una relación entre determinados clones y áreas geográficas (Grundmann et al., 2010). De esta forma, en nuestro país, se ha observado que mientras en los años 90 el clon Ibérico (CC247-

ST247-SCC*mecI*) era el predominante, a partir del siglo XXI la mayor parte de las cepas SARM se engloban dentro de un clon derivado del Pediátrico (CC5-ST125-SCC*mecIV*) (Argudin et al., 2009; Gasch et al., 2011; Pérez-Roth et al., 2004; Pérez-Vázquez et al., 2009). No obstante, debe tenerse en cuenta que algunos linajes clonales han sido capaces de diseminarse a lo largo del mundo constituyendo una amenaza global para la salud pública (Stefani et al., 2012).

4.2. SARM en la comunidad (SARM-AC)

SARM es una importante causa de infección nosocomial en todo el mundo, pero desde los años 90, la epidemiología de este microorganismo ha sufrido importantes cambios. De esta forma, la emergencia de estas bacterias pasó a no ser un fenómeno exclusivo del ámbito hospitalario. En 1993, en Australia, en un aborigen de una comunidad aislada se describió por primera vez una infección causada por SARM-AC (Udo et al., 1993). Hoy en día, cada vez son más los trabajos que hacen referencia a infecciones por SARM en pacientes de la comunidad sin contacto previo con el sistema sanitario, y sin los factores de riesgo típicos asociados a la infección por este microorganismo (Lo et al., 2009; Makgotlho et al., 2009; Zaoutis et al., 2006). Se trata en su mayoría de infecciones de piel y partes blandas, aunque también pueden causar neumonía necrosante, o bacteriemias. El contagio y diseminación es principalmente por contacto directo, y pueden producir pequeños brotes tal y como se han descrito en determinados grupos de población (jugadores de deportes de contacto, soldados, reclusos, tatuados, guarderías) (Deresinski et al., 2005). Los primeros casos fueron esporádicos, pero actualmente la prevalencia de estas cepas adquiridas en la comunidad está aumentando.

Son varios los clones que se asocian a infecciones comunitarias y que se han ido diseminando por todo el mundo. En EEUU constituyen una verdadera endemia, donde ha llegado a ser el causante de la mayoría de infecciones de piel y partes blandas. Entre los clones predominantes destacan USA300, en mayor medida, y USA400 (ST8 y ST1, respectivamente) descritos principalmente en EEUU aunque también se han encontrado casos en países europeos (Faria et al., 2005), en Australia (Nimmo et al., 2008) y en Asia (Shibuya et al., 2008). Otros ST relacionados con SARM-AC son ST8,

ST5, ST30, ST80 y ST59, siendo los tres primeros los más habituales en Europa (Cercenado et al., 2008; Manzur et al., 2008; Vandenesch et al., 2003).

Las cepas SARM-AC y las cepas SARM-AH difieren no solamente en su cuadro clínico y en su epidemiología, sino que presentan en general características fenotípicas y genéticas distintas. Estas cepas se diferencian por la secuencia tipo obtenida por MLST y por los patrones de bandas obtenidos por PFGE. Además, las cepas SARM-AC se asocian con los SCC*mec* tipo IV, V y VII (Ellington et al., 2009; Vandenesch et al., 2003), que normalmente sólo poseen el gen *mecA*, algo que concuerda, al ser estas cepas generalmente sensibles a la mayoría de antibióticos no β -lactámicos. Sin embargo, existen excepciones, de manera que el clon USA300 (ST8) presenta una resistencia elevada a macrólidos con presencia del gen *msr(A)* y también es capaz de adquirir los genes *erm(A)* y *erm(C)* así como *tet(K)* y *tet(M)* siendo resistente a clindamicina y tetraciclina (Tenover et al., 2009). Por otro lado, se ha observado como las cepas perteneciente al ST80 presentan en muchas ocasiones el gen *fusB* capaz de proporcionar resistencia al ácido fusídico (Larsen et al., 2008).

Asimismo, se ha observado una estrecha relación entre la presencia de los genes *lukS/lukF*-PV codificantes de un factor de virulencia conocido como Leucocidina de Panton Valentine (LPV) y las cepas SARM-AC (Vandenesch et al., 2003). Estudios recientes han determinado que existen otras toxinas que pueden contribuir a la virulencia de los SARM-AC, este es el caso de la α - y γ -hemolisina (Smith et al., 2005) o de las enterotoxinas b y c (Fey et al., 2003).

En la actualidad se está produciendo un rápido aumento en la prevalencia de SARM-AC en algunos países, principalmente en EEUU y, a menudo, está sustituyendo a las cepas propiamente hospitalarias (Kallen et al., 2010; Stefani et al., 2012). De forma que, hoy en día, la barrera entre ambos tipos es cada vez menor. Esto se refleja en que cepas consideradas SARM-AC en ocasiones están presentando fenotipos de resistencias a antibióticos no β -lactámicos, no propios de estos clones. Además, se ha visto como a veces presentan SCC*mec* de tipo I, II o III más propios de ambientes nosocomiales, y pueden no presentar los factores de virulencia propios de estos clones (Deresinski et al., 2005; Jeong et al., 2007).

Tabla 5.- Diferencias entre SARM-AH y SARM-AC.

	SARM-AC	SARM-AH
SCC <i>mec</i>	IV, V, VII	I, II, III
<i>agr</i>	I, II	III
Virulencia	PVL	No PVL
Fenotipo de resistencia	-Generalmente sólo resistentes a β -lactámicos	-A menudo multirresistentes
Paciente tipo	-Niños y jóvenes; atletas y deportistas; personal militar; reclusos; drogadictos	-Ancianos, personas debilitadas o con infecciones crónicas
Factores de riesgo	-Deportistas de contacto, reclusos, guarderías, drogadictos, soldados	-Inmunodeprimidos, cirugía, catéteres, hospitalización previa
Cuadro clínico	-Infección de piel y partes blandas en general leves -Grave en casos de neumonía necrótica, bacteriemia, shock séptico	-Cuadros clínicos graves. A menudo bacteriemia o neumonía

4.3. SARM en animales

SARM también puede aislarse de animales, ya sea como causante de infecciones o formando parte de la microbiota natural. El primer caso de infección causada por este microorganismo se describió en vacas con mastitis (Devriese et al., 1972), y desde entonces, se han aislado cepas SARM en diferentes especies de animales de producción (Lee, 2003; Voss et al., 2005). También se han descrito casos de SARM en animales de compañía, como perros y gatos y en caballos (Leonard et al., 2008). Recientemente, se ha identificado el riesgo para el ser humano de ser colonizado por SARM asociado a animales (Lee, 2003; Voss et al., 2005; Weese et al., 2005b). Los animales pueden, por tanto, actuar como reservorio natural de SARM teniendo un papel de gran importancia en la epidemiología de este microorganismo.

Animales de producción

Como se mencionó anteriormente, el primer caso de SARM de fuente no humana se detectó por primera vez en una muestra de leche de una vaca con mastitis (Devriese et al., 1972). Aunque la prevalencia en ganado vacuno parece ser baja (Lee, 2003), este microorganismo puede causar serias infecciones en estos animales (García-Álvarez et al., 2011; Kwon et al., 2005). SARM se ha aislado también en animales de producción enfermos o sanos de otras especies como cerdos (Voss et al., 2005), y en

menor medida en pollos (Lee, 2003; Nemati et al., 2008), ovejas y conejos (Leonard et al., 2008). Los estudios de tipado molecular parecen demostrar que las líneas genéticas de cepas SARM aisladas de cerdos, así como las aisladas de vacas, difieren con respecto a aquellas encontradas hasta la fecha en los seres humanos (Kwon et al., 2005; Van Loo et al., 2007).

5. APARICIÓN Y DISEMINACIÓN DE SARM CC398

En los últimos años ha emergido en diferentes países de todo el mundo una nueva variante de SARM, la cual es no tipable por PFGE cuando la enzima utilizada es *SmaI*, y pertenece al Complejo Clonal CC398. A este linaje clonal se le engloba en el denominado SARM asociado a ganado (SARM-AG) y se describió por primera vez en cerdos de Holanda en 2005 (Voss et al., 2005). Desde entonces ha habido un continuo aumento en el número de casos descritos en estos animales en varios países europeos (Gómez-Sanz et al., 2009; de Neeling et al., 2007; Pomba et al., 2009; Witte et al., 2007), en Canadá (Golding et al., 2010), en Estados Unidos (Mediavilla et al., 2012; Smith et al., 2008), en Asia (Cui et al., 2009; Lim et al., 2012; Sergio et al., 2007) y en Sudamérica (Arriola et al., 2011). El principal reservorio de la variante SARM CC398 es el cerdo (Wulf et al., 2008), aunque no se conocen los determinantes especie-específicos que favorecen esta situación (EFSA, 2009). El origen de CC398 no está muy claro, pero estudios recientes sugieren que SARM-AG CC398 podría provenir de cepas SARM CC398 de origen humano (Price et al., 2012). Parece ser que una vez en el ganado las cepas adquieren resistencia a meticilina y a tetraciclina debido al uso excesivo de estos antibióticos (Price et al., 2012). También se ha sugerido que compuestos de zinc, los cuales se usan a menudo para prevenir o tratar diarrea en cerdos, podrían haber contribuido a la emergencia de este clon (Cavaco et al., 2011, Moondley et al., 2011). Es destacable, además, la gran diversidad de tipos de *SCCmec* (IV, V, VII-variante, IX, X) que han sido detectados en esta variante genética (Li et al., 2011; Price et al., 2012). Así mismo, hasta el momento se han detectado más de 25 tipos de *spa* relacionados a este CC (Vanderhaeghen et al., 2010) lo que sugiere que el elemento *SCCmec* se ha introducido en múltiples momentos (Graveland et al., 2011a). Además, cepas con el mismo tipo de *spa* pueden presentar distinto tipo de *SCCmec* lo que ha llevado a pensar que son los *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN)

presentes en las granjas los que actúan como reservorios del SCC*mec* (Hanssen et al., 2006). Aunque la resistencia a tetraciclina y meticilina son las más habituales en SARM CC398 se han detectado algunas cepas resistentes también a macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, trimetoprim o incluso quinolonas (Vanderhaeghen et al., 2010). De hecho, se han descrito nuevos genes de resistencia (*dfrK*, *vga(E)*, *apmA*) en cepas de esta variante lo que lleva a pensar en que SARM CC398 actúa como reservorio y donador de los mismos (Kadlec et al., 2012). Asimismo, es destacable la detección del fenotipo inusual de resistencia a lincosamidas y/o estreptograminas y sensibilidad a macrólidos en algunas cepas SARM CC398 asociado fundamentalmente a determinados genes como *vga(A)*, *vga(C)*, *vga(E)* o *cfr* (Argudín et al., 2011; Hauschild et al., 2012; Kadlec et al., 2010).

Al igual que SARM de otras líneas genéticas, SARM CC398 se encuentra principalmente en las fosas nasales y otras mucosas de los animales colonizados. Aunque esta variante genética se asocia más con portadores asintomáticos en animales de producción, y en especial en cerdos, también se ha aislado como agente etiológico de infecciones en animales (Armand-Lefevre et al., 2005; Sergio et al., 2007; Van Duijkeren et al., 2007; Vanderhaeghen et al., 2010a). No obstante, la transferencia de genes de virulencia en SARM CC398 parece ser poco común (Smith et al., 2010b). De esta forma, ciertos factores de virulencia de importancia como serían la LPV o la TSST no aparecen generalmente en estas cepas. Aún así, se han descrito casos de cepas SARM CC398 LPV-positivas en cerdos en Asia y en Europa (Welinder-Olsson et al., 2008; Yu et al., 2008).

Aunque SARM CC398 está más relacionado con animales de granja (cerdos, vacas, aves de corral) (Graveland et al., 2010; Monecke et al., 2007; Nemati et al., 2008; Wulf et al., 2008) también se ha aislado en animales de compañía y caballos (Cuny et al., 2008; Nienhoff et al., 2009; Van den Eede et al., 2009; Witte et al., 2007).

5.1. Transferencia de SARM CC398 de animales al hombre

Dada la elevada prevalencia de SARM CC398 en cerdos, era de esperar que personas en contacto directo con estos animales (especialmente granjeros, trabajadores de matadero y veterinarios) tuvieran un mayor riesgo de colonización, y consecuentemente de infección (Armand-Lefevre et al., 2005; Khanna et al., 2008). De hecho, un estudio llevado a cabo en Holanda en 2005 estimó que la prevalencia de

portadores asintomáticos de SARM entre granjeros de cerdos era 760 veces superior que en la población sin contacto con estos animales (Voss et al., 2005). También se ha observado una elevada prevalencia de portadores nasales asintomáticos entre los familiares de los granjeros (Khanna et al., 2008; Lewis et al., 2008; Voss et al., 2005) lo que nos lleva a pensar en una transmisión de SARM CC398 de humano a humano. Existen pocos estudios que hayan estudiado la transmisibilidad de SARM CC398 en humanos pero algunos de ellos 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). No obstante, estos resultados deben interpretarse con cuidado ya que faltan datos sobre las características de los pacientes y la homogeneidad en cuanto el estado de portador de SARM-AH y SARM-AG. Otro dato de interés es que la prevalencia de SARM en los trabajadores y sus familiares parece disminuir en periodos en los que el contacto con animales es menor, como es el caso de vacaciones prolongadas o entre ciclos de producción (Graveland et al., 2011b). Esto sugiere que SARM-AG es poco capaz de persistir en la mayoría de los humanos. Aún así, en algunos casos se han detectado cepas SARM CC398 en personas sin contacto estrecho con animales no conociéndose la fuente de la contaminación (Krziwanek et al., 2009).

SARM CC398 puede encontrarse en humanos tanto como agente colonizador (Armand-Lefevre et al., 2005) como agente patógeno (Voss et al., 2005). Son varios los casos de infecciones en humanos debidas a esta variante genética que han sido descritos en algunos países europeos (Krziwanek et al., 2009; Witte et al., 2007; Wulf et al., 2008). Se trata de infecciones de piel y tejidos blandos en su mayoría aunque, en ocasiones, se han relacionado con infecciones severas (Hartmeyer et al., 2010; Krziwanek et al., 2009; Mammina et al., 2010; Pan et al., 2009; Wulf et al., 2008). Conviene destacar un caso reciente de suma gravedad (Rasigade et al., 2010) en el que el agente responsable fue SARM CC398 con el tipo de *spa* t571 el cual parece tener un origen humano (Davies et al., 2011).

5.2. Otros linajes de SARM-AG

Además de CC398 existen otras líneas genéticas de SARM que se han asociado a animales de producción. De esta forma, en países asiáticos (China, Malasia y Tailandia), el clon más comúnmente encontrado en cerdos es SARM CC9 (Cui et al.,

2009; Larsen et al., 2012; Neela et al., 2009; Vestergaard et al., 2012; Wagenaar et al., 2009). No obstante, en un estudio llevado a cabo en Corea no se identificó SARM CC9, siendo SARM CC398 el encontrado principalmente (Lim et al., 2011). Por otro lado, aunque la variante SARM CC9 parece estar localizada en países asiáticos se ha identificado también en cerdos de Italia (Battisti et al., 2010). Otras líneas de SARM-AG podrían ser CC49 en Suiza (Overesch et al., 2011), CC97 en España (Gómez-Sanz et al., 2010) o CC30 en Portugal (Pomba et al., 2009).

Una mención especial merece el CC130 el cual parece estar asociado a ganado vacuno. Recientes estudios han descubierto la presencia de un nuevo gen *mecA* en cepas pertenecientes a este CC (García-Álvarez et al., 2011; Shore et al., 2011). Parece que estas cepas podrían tener un origen bovino aunque también han sido detectadas en humanos (Cuny et al., 2011; García-Álvarez et al., 2011).

Tabla 6.- Complejos clonales asociados a animales y las especies en las cuales han sido encontradas.

Complejo Clonal	Humanos o especie animal	Referencias
CC1	Humanos, vacas, caballos, pollos	Lowder et al., 2009; Smyth et al., 2009
CC5	Humanos, pollos, pavos	Lowder et al., 2009; Smyth et al., 2009
CC8	Humanos, caballos, vacas	Sakwinska et al., 2011; Walther et al., 2009
CC9	Cerdos	Armand-Lefevre et al., 2005; Cui et al., 2009
CC30	Humanos, cerdos	Melles et al., 2008; Pomba et al., 2009
CC49	Humanos, cerdos	Overesch et al., 2011; Simpson et al., 2010
CC97	Humanos, cerdos, vacas	Ellington et al., 2008; Gómez-Sanz et al., 2010; Smith et al., 2005; Smyth et al., 2009
CC121	Humanos, conejos	Vancraeynest et al., 2006
CC130	Humanos, vacas	Cuny et al., 2011; García-Alvarez et al., 2011; Guinane et al., 2010; Sung et al., 2008
CC133	Humanos, ovejas, cabras, vacas	Ben Zakour et al., 2008; Guinane et al., 2010; Smyth et al., 2009
CC705	Vacas	Herron-Olson et al., 2007; Smith et al., 2005
CC385	Pollos, aves salvajes	Lowder et al., 2009; Smyth et al., 2009
CC398	Humanos, cerdos, vacas, pollos, caballos	Cuny et al., 2010
CC425	Vacas	García-Alvarez et al., 2011
ST1464 (singleton)	Ovejas	Elbir et al., 2010; de la Fuente et al., 2011

6. DETECCIÓN DE SARM EN ALIMENTOS

S. aureus también es conocido por estar implicado en intoxicaciones alimentarias. En estos casos no es la bacteria sino las enterotoxinas producidas por la misma las responsables de la intoxicación. Existen diferentes tipos de enterotoxinas que están codificadas por los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *seq* y *seu* (Chiang et al., 2008). Aunque no se conoce la incidencia exacta de las intoxicaciones producidas por *S. aureus* se cree que podría ser la causa más común en EEUU (Kluytmans et al., 2010).

Las cepas de *S. aureus* presentes en los alimentos pueden tener un origen humano o animal, de forma que el alimento puede contaminarse al ser procesado por manipuladores colonizados o bien el microorganismo puede estar presente en la materia prima. De ahí que los alimentos donde es más probable encontrar este microorganismo son aquellos que requieren gran elaboración, “productos preparados”, o aquellos que tienen un origen animal, es decir, productos cárnicos o lácteos. Los alimentos más frecuentemente relacionados con intoxicaciones por *S. aureus* son productos derivados de aves, carnes poco cocinadas o crudas, o productos de pastelería.

No existen muchos estudios sobre la detección de SARM en alimentos pero la emergencia de la nueva variante genética SARM CC398 ha favorecido el aumento de estos trabajos. De esta forma, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria llevó a cabo un estudio de vigilancia en 2009 con el fin de conocer cual era la situación y que medidas podrían establecerse (EFSA, 2009). Los alimentos más estudiados han sido productos lácteos y productos cárnicos crudos. En el primer caso la tasa encontrada va del 0,18% (Kwon et al., 2005) y 1,3% (Haran et al., 2012) hallados en Korea y EEUU respectivamente, al 10% (Farzana et al., 2004) detectado en Pakistán. En las investigaciones llevadas a cabo en productos cárnicos los resultados son similares con tasas de contaminación que van desde la no detección de SARM (Huber et al., 2010; Kaszanyitzky et al., 2003) o porcentajes de detección muy bajos (<2%) (Hanson et al., 2011; Kerouanton et al., 2007; Kitai et al., 2005), a valores más elevados (2-12%) (de Boer et al., 2009; Pu et al., 2009; van Loo et al., 2007; Weese et al., 2010a; Weese et al., 2010b). La diferente metodología aplicada y el diferente tipo y número de muestras podrían explicar en parte las diferencias detectadas en estos estudios. Aunque las comparaciones son por ello no recomendables, se puede decir que los valores más bajos

se detectan en países asiáticos mientras en centro Europa se obtienen valores más elevados. Además, los estudios más recientes muestran en general valores superiores siendo destacable un estudio llevado a cabo en Alemania que mostró una prevalencia del 37% (Fessler et al., 2011). Hasta el momento de esta tesis no se había realizado ningún estudio en España de este tipo.

El tipado molecular es una importante herramienta para conocer el origen de las cepas SARM encontradas en los alimentos. De esta forma se han hallado cepas con líneas genéticas asociadas a infecciones en humanos tanto del tipo SARM-AH (Pu et al., 2009) como SARM-AC (Kwon et al., 2005; Pu et al., 2009; Waters et al., 2011). Por otra parte, también se han detectado cepas SARM de la nueva variante CC398, asociada con animales (de Boer et al., 2009; Fessler et al., 2011; van Loo et al., 2007; Weese et al., 2010a).

Por lo tanto, podemos afirmar que la cadena alimentaria puede ser un vehículo de transmisión de cepas SARM constituyendo un riesgo importante principalmente para el personal encargado de su manipulación. De ahí la necesidad de tomar medidas de protección y medidas higiénicas adecuadas como el uso de guantes, gorros y mascarillas. El riesgo de SARM para el consumidor deriva de su capacidad para producir enterotoxinas y no es mayor que el de cepas SARM. Hasta el momento, se han descrito dos brotes de intoxicaciones alimentarias causadas por SARM (Jones et al., 2002; Kluytmans et al., 1995).

Existen diferentes procedimientos con los que podemos reducir la posible presencia de *S. aureus* en los alimentos. No hay que olvidar que se trata de un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales, y difícil de erradicar. Soporta bien las condiciones extremas aunque puede eliminarse con una cocción correcta. Gracias a una correcta refrigeración, además, podemos evitar que la bacteria produzca las toxinas que desencadenan la toxiinfección.

7. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS NO β -LACTÁMICOS EN *S. aureus*

S. aureus es capaz de adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos desarrollando múltiples mecanismos de resistencia que pueden afectar a distintas estructuras celulares o rutas metabólicas. Para ello este microorganismo puede sufrir

mutaciones en sus genes o pueden adquirir genes de otras especies o géneros dando lugar a diferentes mecanismos de resistencia (**Figura 4**):

- Alteración de la permeabilidad de la membrana o pared celular.
- Expulsión activa del antibiótico al exterior de la célula.
- Modificación o protección de la diana.
- Inhibición o inactivación enzimática del antibiótico.

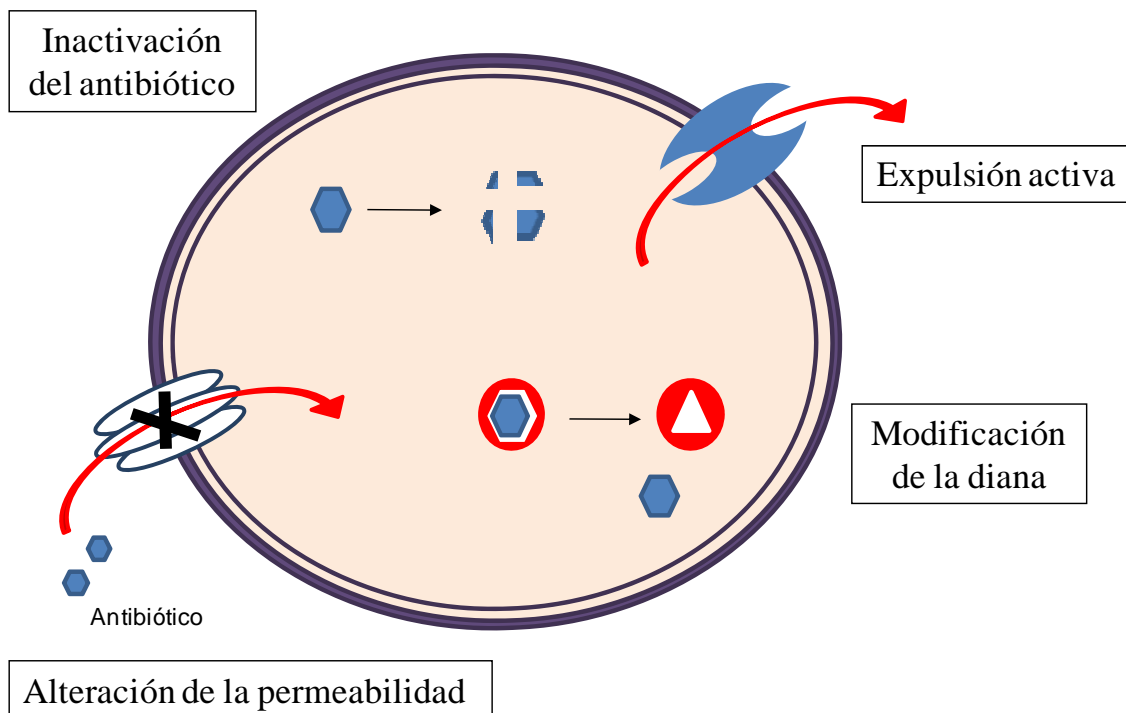


Figure 4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS)

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas presentan diferencias estructurales pero forman parte de un mismo grupo de antibióticos porque comparten mecanismos de acción y de resistencia. Todos ellos actúan sobre la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la translocación de la cadena peptídica en la síntesis proteica, aunque cada uno tiene un sitio de unión distinto. Se han descrito diversos mecanismos de resistencia a estos antibióticos en bacterias Gram positivas que se basan en:

- 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.
- 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)*.
- Inactivación del antibiótico gracias a la acción de enzimas codificadas por los genes *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *vat*, *vgb* y *mph(C)*.

Existen 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 el *erm(C)* son los más frecuentemente encontrados en *S. aureus*. Se cree que el primero es más habitual en SARM y el segundo en SASM (Schmitz et al., 2000) aunque se han encontrado casos en los que esto no se cumple (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 en el segundo caso la eritromicina la 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, LS_A, S_A, S_B consistentes en resistencia a lincosamidas, lincosamidas y estreptograminas 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*. Estos genes han sido detectados en *Staphylococcus* spp. pero de manera muy ocasional y en los últimos años se han asociado a cepas SARM de origen animal (Kadlec et al., 2010; Smith et al., 2008). En el caso del gen *cfr* es importante destacar que se asocia con resistencia combinada a lincosamidas, estreptograminas, fenicoles, pleuromutilinas, y oxazolidinonas debido a la acción de una metiltransferasa sobre la posición A2503 del ARNr 23S (Kehrenberg et al., 2006).

Oxazolidinonas

Linezolid es el primer antibiótico comercializado del grupo oxazolidinonas. Este antibiótico se utiliza principalmente en el tratamiento de infecciones graves causadas por patógenos que son resistentes a varios grupos de antibióticos, incluyendo cepas SARM. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la unión de N-formilmetionil-ARNt al ribosoma afectando también a la subunidad 50S. Desde su aprobación en el año 2000, ha aparecido raramente resistencia a este antibiótico siendo más común en SCN y enterococos (Gómez-Gil et al., 2009; Meka et al., 2004). Esta resistencia se debe sobre todo a mutaciones en la diana (ARNr 23S) (Meka et al., 2004), aunque también se han descrito mutaciones en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22 (Mendes et al., 2010). Además, el gen *cfr* anteriormente mencionado, también proporciona resistencia a este antibiótico (Kehrenberg et al., 2006).

Fenicoles

Los fenicoles son un grupo de antibióticos que se unen a la subunidad 50S del ribosoma bloqueando la síntesis de proteínas al inhibir la actividad de la enzima peptidil transferasa. Se desarrolla resistencia a estos antibióticos mediante producción de enzimas inactivadoras, modificación de la diana (lo que puede ir unido a resistencia a otros antibióticos) y disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana. Los mecanismos más comúnmente detectados en *Staphylococcus* spp. son los mediados por los genes *cat*, y en menor medida por los genes *cfr* y *fexA* (Kehrenberg et al., 2006; Schnellmann et al., 2006).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica por unión a la subunidad 30S del ribosoma. La resistencia a tetraciclinas en *S. aureus* es bastante frecuente y puede ser debida a un aumento del eflujo activo o a una protección del ribosoma. El primer mecanismo se caracteriza por estar codificado por los genes *tet(K)* y *tet(L)* y el segundo por los genes *tet(M)* y *tet(O)*. Los genes más habitualmente encontrados en *S. aureus* son *tet(K)* (el cual produce sólo resistencia a tetraciclina) y *tet(M)* (que implica resistencia cruzada a tetraciclina, doxicilina y minociclina) (Schmitz et al., 2001).

Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos actúan inhibiendo la síntesis proteica tras unirse de manera irreversible a la subunidad 30s del ribosoma bacteriano. Interfieren en la elongación de la cadena peptídica e inducen una traducción equivocada del ARNm lo que causa una incorporación errónea de aminoácidos dando lugar a la síntesis de proteínas anómalas. 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 modificantes codificadas por los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, kanamicina y estreptomina), *ant(4')-Ia* (confiere resistencia a tobramicina y kanamicina), *aph(3')-IIIa* (confiere resistencia a kanamicina) y *ant(6)-Ia* (confiere resistencia a estreptomina).

Quinolonas

Las quinolonas actúan interfiriendo la acción de la ADN-girasa cromosómica y de la topoisomerasa IV bacteriana. La resistencia en *S. aureus* a las mismas se produce o por alteración de la diana debido a mutaciones en las subunidades GrlA y GrlB (ADN topoisomerasa IV) y GyrA y GyrB (ADN-girasa), o bien por alteración en la entrada del antibiótico mediante mutaciones en el gen *norA* (Nakanishi et al., 1991). Por norma general, las mutaciones responsables de la resistencia en *S. aureus* suelen producirse primero en la proteína GrlA (siendo la más común Ser80Phe) y posteriormente en GyrA (detectándose normalmente Ser84Leu).

Diaminopirimidinas

El trimetoprim es una diaminopirimidina que es bacteriostático y que inhibe la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), quedando la bacteria deficiente de folato el cual es esencial para la biosíntesis de purinas, y por tanto de ADN. Los mecanismos de resistencia más frecuentes frente a este antibiótico son eflujo del antibiótico o permeabilidad reducida, mutación natural en los genes *dhfr* codificantes de las DHFR, sobreproducción de las enzimas DHFR y producción de enzimas DHFR adicionales resistentes a trimetoprim (Huovinen, 2001). El mecanismo más frecuentemente encontrado en *Staphylococcus* spp. es la producción de enzimas DHFR

adicionales codificadas por los genes *dfS1* (también conocido como *dfrA*), *dfrD*, *dfrG* y el recientemente descrito *dfrK* (Kadlec et al., 2009; Kadlec et al., 2010).

Mupirocina

La mupirocina inhibe la síntesis bacteriana de proteínas mediante la unión a la isoleucil-ARNt sintetasa impidiendo la incorporación de isoleucina a las proteínas (Morton et al., 1995). Se distinguen dos mecanismos de resistencia uno de ellos mediado por mutaciones en el gen nativo codificante de la enzima isoleucil-ARNt-sintetasa (*ileS*) y el otro debido a la adquisición de un plásmido que contiene el gen *mupA* (también conocido como *ileS2*) que codifica una enzima isoleucil-ARNt-sintetasa adicional sin afinidad por mupirocina . El primero da lugar a resistencia de bajo nivel y el segundo de alto nivel (Cookson, 1998)

Fusidanos

El ácido fusídico es un inhibidor de la síntesis proteica bacteriana que se une al factor de elongación G (FE-G) impidiendo que sea liberado del ribosoma. La resistencia a este antibiótico en *Staphylococcus* spp. puede deberse a mutaciones en el gen codificante del FE-G (*fusA*) o a la adquisición del gen *fusB* el cual codifica una proteína que se une al FE-G y lo protege de la acción del antibiótico. Otros genes denominados *fusC* y *fusD* son muy similares a este último y han sido descritos en diferentes especies de *Staphylococcus* (McLaws et al., 2008; O'Neill et al., 2007).

Glucopéptidos

El mecanismo de acción de los antibióticos glucopeptídicos se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular. A diferencia de los β -lactámicos, que actúan sobre las enzimas encargadas de la síntesis del peptidoglicano, los antibióticos glucopeptídicos actúan sobre los sustratos de éstas. Dentro de este grupo de antibióticos la vancomicina se ha considerado el principal tratamiento para infecciones producidas por SARM. Sin embargo, las primeras cepas resistentes ya han aparecido (Appelbaum, 2006) y se ha observado que existen dos mecanismos de resistencia para estos antibióticos. Uno de ellos proporciona bajo nivel de resistencia y se debe a un engrosamiento de la pared celular y un aumento de la expresión de la PBP2a y el otro proporciona un mayor nivel de resistencia y se debe a la adquisición del gen *vanA* (CDC, 2002).

En la siguiente **Figura** se muestran las dianas en la célula bacteriana de los agentes antimicrobianos citados anteriormente:

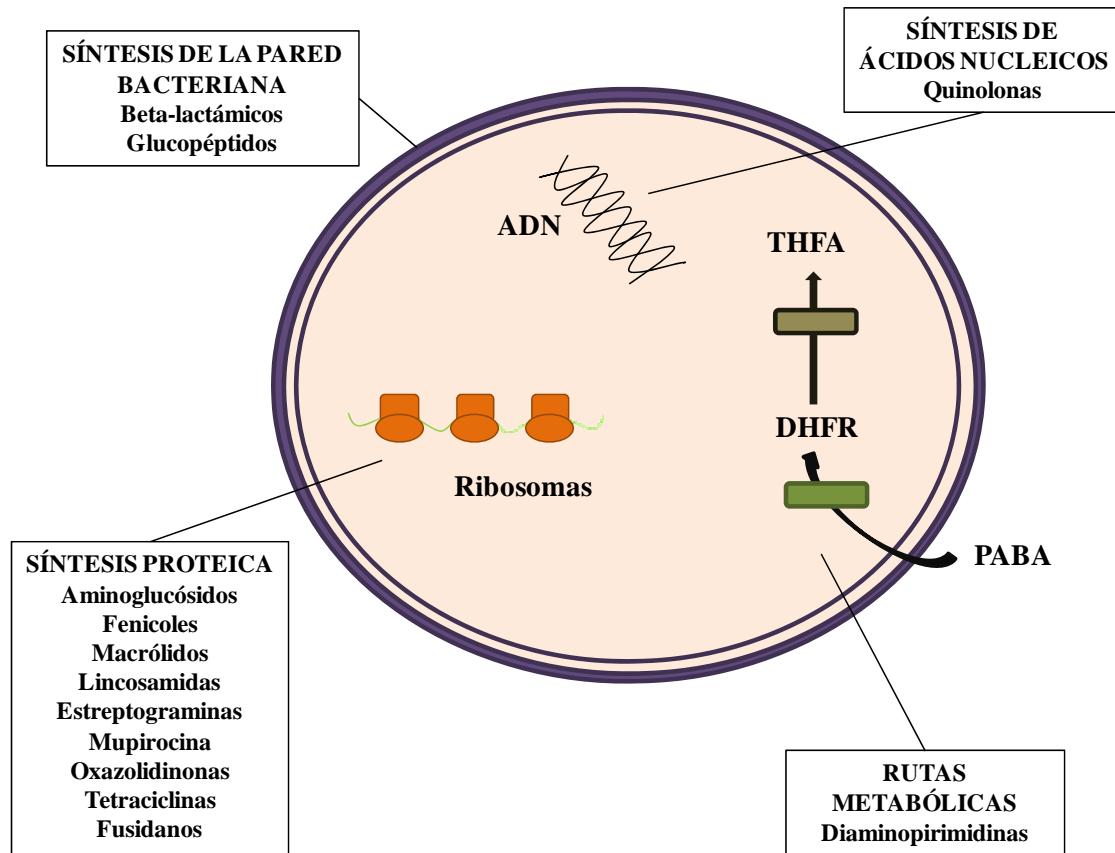


Figura 5. Dianas de los agentes antibióticos usados comúnmente contra *S. aureus*.

8. FACTORES DE VIRULENCIA

Leucocidina de Pantón-Valentine

Una de las toxinas más virulentas y conocidas es la Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). Sólo el 2-3% de las cepas de *S. aureus* producen esta leucotoxina que provoca destrucción leucocitaria y necrosis tisular. Descubierta en 1932 por Pantón y Valentine (Pantón et al., 1932), esta toxina está compuesta por dos subunidades proteicas, la F y la S, sintetizadas independientemente. Estas subunidades actúan de forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocitarias induciendo la formación de poros, alterando la permeabilidad y destruyendo así a la célula. Su presencia se ha asociado a la aparición de infecciones de piel y partes blandas y neumonías necrotizantes (con una mortalidad muy elevada) en jóvenes y niños (Lina et al., 1999;

Gillet et al., 2002). Sin embargo, raramente es responsable de otras infecciones producidas por *S. aureus* como osteomielitis, septicemia o endocarditis.

Toxinas pirogénicas superantígenos (PTSAg)

Se trata de un grupo de toxinas exocelulares que comparten características bioquímicas y que engloban 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).

La TSST, denominada así por ser la causante del Síndrome de Shock Tóxico (SST), se describió por primera vez en niños y jóvenes entre 8 y 17 años (Todd et al., 1978). Esta toxina da lugar a un cuadro clínico consistente en fiebre elevada, dolor de cabeza, desorientación, vómitos, diarrea y erupciones. En los años 80 se empezaron a reportar más casos y pronto se asoció al uso de tampones en mujeres jóvenes. Se observó que en estos casos las pacientes presentaban una colonización intravaginal de cepas de *S. aureus* productoras de TSST (Torres et al., 2001). Posteriormente nuevas variantes fueron descritas, la TSST ovina y la TSST bovina (Lee et al., 1992).

En cuanto a las enterotoxinas estafilocócicas, hasta el momento se han descrito 18 y algunas de ellas presentan variantes, ese es el caso de SEC, SEG, SEH y SEI. Estas toxinas son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas siendo las responsables de las toxiinfecciones alimentarias causadas por *S. aureus*.

Toxinas exfoliativas

Dentro de las toxinas exfoliativas se distinguen tres de origen humano A, B y D y otra de origen animal C, que fue descrita en caballos. Estas toxinas son las responsables del síndrome de la piel escaldada estafilocócica, enfermedad que suele afectar a niños y que se caracteriza por la pérdida de capas superficiales de piel, deshidratación e infecciones secundarias por otros microorganismos.

Hemolisinas

Hasta el momento se han descrito cinco hemolisinas: alfa, beta, gamma, delta y gamma variante. Estas toxinas se encuentran en general presentes en la mayor parte de las cepas de *S. aureus*. La primera en ser descubierta fue la toxina alfa-hemolisina la cual se ha observado que tiene actividad dermonecrótica y neurotóxica siendo letal para gran variedad de sistemas animales. Sin embargo, el papel de esta toxina en producir

enfermedad en humanos no ha sido establecido totalmente. En el caso de la hemolisina beta su papel en la enfermedad no está tampoco claro aunque se cree que proporciona algún tipo de ventaja debido a su alto nivel de expresión (Dinges et al., 2000). La hemolisina delta tiene efectos negativos principalmente sobre los leucocitos, habiéndose demostrado que su capacidad letal y dermonecrotica es menor que la de la hemolisina alfa (Gordon et al., 1976). La hemolisina gamma se caracteriza por ser, al igual que la PVL, una toxina formada por dos componentes, de la cual se ha descrito una variante (Dinges et al., 2000).

Tabla 7.- Clasificación de las toxinas más conocidas de *S. aureus*

Factor de virulencia	Genes	Función
Toxina TSST-1	<i>tst</i>	Causa el Síndrome del Shock Tóxico (SST)
Toxinas exfoliativas	<i>eta, etb, etc, etd</i>	Causa Síndrome de piel escaldada, impétigo en neonatos y/o enfermedad de Ritter
Enterotoxinas	<i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser, seq, seu</i>	Intoxicación alimentaria
Leucocidinas (especialmente LPV)	<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	Alteración de la permeabilidad celular, destrucción leucocitaria
Hemolisinas	<i>hla, hlb, hld, hlg, hlg-2</i>	Ruptura de membranas celulares

9. ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

Gracias a diferentes técnicas de tipado molecular se ha podido observar como muchos de los genes cromosómicos de *S. aureus* son heredados de manera vertical. Sin embargo, gracias a la transferencia horizontal mediada por elementos genéticos móviles (EGMs) esta especie ha ido evolucionando y adaptándose al medio. Estos EGMs son definidos como fragmentos de ADN que contienen genes de virulencia o resistencia a antimicrobianos así como genes que codifican enzimas que permiten su transferencia e integración (Frost et al., 2005). Existen muchos tipos de EGMs en *S. aureus* como son los plásmidos, transposones (Tn), secuencias de inserción (IS), bacteriófagos, islas de patogenicidad (SaPIs) y casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC). Es importante destacar que la mayor parte de los genes codificados por estos EGMs se controlan por

reguladores que forman parte del genoma central o “core genome” (Malachowa et al., 2010). Además, aunque la transferencia genética es común entre organismos pertenecientes a la misma especie o al mismo género, este proceso también se ha detectado entre bacterias de diferentes géneros, e incluso entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena capaces de replicarse de manera independiente. Estas moléculas varían en tamaño, desde unas pocas kilobases (kb) hasta cientos de ellas, y en contenido genético. Generalmente los plásmidos no contienen genes esenciales para el crecimiento de la bacteria, sino genes de resistencia o virulencia que aportan a la bacteria ventajas evolutivas. Se ha observado como en el género *Staphylococcus* las cepas son capaces de portar uno o más plásmidos diferentes (Malachowa et al., 2010). Existen diferentes tipos de plásmidos estafilocócicos descritos hasta el momento. Por un lado podemos diferenciarlos según su mecanismo de replicación encontrándonos con pequeños plásmidos que replican según el mecanismo del círculo rodante (Khan, 2005) o plásmidos de gran tamaño que utilizan la replicación conocida como tipo theta. También se pueden distinguir según su capacidad de transferencia en conjugativos y movilizables. Para que un plásmido sea conjugativo es necesario que contenga genes codificantes de proteínas que permitan su transferencia. Sin embargo, estos plásmidos no son muy habituales en *S. aureus* sino que cuando se encuentran, suelen provenir de otras especies o géneros como *Enterococcus* spp. (Lindsay, 2010). En el caso de los plásmidos movilizables, al no poseer genes que permitan la transferencia, lo que hacen es aprovechar la maquinaria existente en otros plásmidos. Hasta el momento, se ha observado que *S. aureus* posee una habilidad limitada para adquirir ADN del medio si lo comparamos con otras bacterias como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. De esta forma, se cree que lo más probable es que la transducción, y en menor medida la conjugación, sean los mecanismos más comunes de transferencia intercelular de plásmidos estafilocócicos (Malachowa et al., 2010). Por otro lado, además de los plásmidos podemos encontrarnos con otros EGMs como transposones, fagos o islas genómicas que facilitan aún más la transferencia de genes entre las células bacterianas (Kuroda et al., 2001; Perichon et al., 2009; Yamaguchi et al., 2002).

Con el fin de conocer más sobre la transferencia horizontal de genes en *S. aureus* se han establecido distintos sistemas de clasificación de plásmidos. El primer sistema surgió en 1989 y dividía los plásmidos en tres clases: i) plásmidos pequeños con replicación por círculo rodante, ii) plásmidos portadores de múltiples genes de resistencia y iii) plásmidos conjugativos (Novick, 1989). Posteriormente se propuso una cuarta clase denominada la familia del plásmido pSK639 considerando que sus características se encontraban entre el primer y el segundo grupo (Fischetti et al., 2006). Por otro lado, se estableció un sistema que identificaba 15 grupos de incompatibilidad dentro del género *Staphylococcus* (Udo et al., 1991). Sin embargo, este sistema pronto fue descartado debido al aumento exponencial del número de plásmidos conocidos (Francia et al., 2004). En otro estudio, se analizaron los plásmidos con tamaño superior a 20kb y se establecieron, por RLFP, tres grupos que fueron denominados con el nombre de unos de sus plásmidos: pIB485, pMW2 y pUSA300HOUMR (Shearer et al., 2011). Por último, recientemente y basándose en la tecnología de la secuenciación, se propuso un nuevo sistema para plásmidos de *Enterococcus* y otras bacterias Gram-positivas (entre ellas *S. aureus*). Este sistema permitía clasificar los plásmidos mediante la amplificación por PCR de regiones conservadas de los genes codificantes de las proteínas de replicación (*rep*) (Jensen et al., 2010).

Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente a bacterias y parece que pueden tener un mayor impacto en la diversidad y evolución del género *Staphylococcus* (Malachowa et al., 2010). Los fagos pueden dividirse en: i) líticos, que lisan a la bacteria completamente durante la liberación de los fagos progénitos, ii) atemperados, que lisan a la bacteria tras la infección pero que pueden permanecer en la bacteria estafilocócica durante mucho tiempo integrándose en el genoma como un profago y iii) crónicos, aquellos que una vez infectada la bacteria libera progenitores sin matarla lo que permite a la bacteria crecer y dividirse. Los bacteriófagos pueden codificar diferentes toxinas como la enterotoxina A o la leucocidina de Pantón-Valentine y están ampliamente distribuidas en cepas de *S. aureus* (Lindsay, 2010). Se cree que todas las cepas llevan algún bacteriófago y algunas pueden contener hasta cuatro. Se ha establecido, además, un sistema de clasificación en función del gen que determina el sitio de integración en el genoma. (Lindsay et al., 2004).

Islas genómicas

Las islas genómicas son partes del genoma que se han originado por transferencia horizontal de genes. Hasta el momento se han descrito tres familias en la especie *S. aureus*: vSA α , vSA β y vSA γ . Estas islas genómicas se encuentran flanqueadas por genes codificantes de transposasas truncados y por sistemas de restricción-modificación (Malachowa et al., 2010).

Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad estafilocócica (SaPIs) son fracciones de ADN genómico que le propocionan virulencia a este género. Se diferencian de los fagos en que no tienen los genes necesarios para la construcción de la cápside, ni las herramientas necesarias para la transferencia horizontal, para lo cual requieren de la presencia de un fago (Lindsay, 2010). Casi todas las SaPIs codifican enterotoxinas o la toxina del síndrome del shock tóxico (Yarwood et al., 2002). Las SaPIs se integran en sitios diferentes del cromosoma (atts) y siempre en la misma orientación (Novick et al., 2007).

Casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC)

Los casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC) son fragmentos de ADN que siempre se insertan en el gen *orfX* del cromosoma de este género y que pueden codificar genes de resistencia o de virulencia. Como hemos visto, en algunas ocasiones este EGM porta el gen *mecA* que es el responsable de la resistencia a meticilina (Malachowa et al., 2010).

Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) son segmentos de ADN que contienen un gen codificante de una transposasa y están flanqueadas por repeticiones invertidas (RI). Aunque las ISs pueden existir en el genoma de *S. aureus* normalmente se encuentran formando parte de transposones compuestos (Byrne et al., 1989). Las ISs están implicadas en deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano y, en algunos casos, pueden formar un promotor híbrido con el promotor nativo de un gen como es el caso de la IS256 y la IS257 y los genes de resistencia *aac(6')*-Ie-*aph(2'')*-Ia y *dfrS1* (Malachowa et al., 2010). Además, se ha observado que algunas ISs, las cuales

forman parte de transposones, pueden dar lugar a formas circulares libres (Prudhomme et al., 2002).

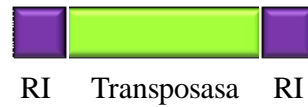


Figura 6. Estructura de una secuencia de inserción.

Transposones

Los transposones son secuencias de ADN que pueden moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula. Existen diferentes tipos de transposones según su estructura y según su capacidad para conjugarse. Se ha establecido un sistema de nomenclatura (Roberts et al., 2008) para los mismos que incluye:

- Transposones de la familia Tn3: son elementos que codifican una enzima involucrada en la excisión e integración (transposasa) y una recombinasa sitio específica (resolvasa). Son transposones de pequeño tamaño que suelen presentar múltiples copias en el genoma. No tienen propiedades conjugativas pero a menudo su elevada diseminación se debe a que muchos de ellos se hallan formando parte de plásmidos conjugativos. Este grupo incluye al Tn554, el cual codifica resistencia a macrólidos y espectinomicina (Murphy, 1983).



Figura 7. Estructura de un transposón de la familia Tn3.

- Transposones compuestos: constan de una región central flanqueada por dos ISs las cuales pueden ser iguales o diferentes y tener la misma o diferente orientación. En la región central pueden contener genes de resistencia. Son transposones de gran tamaño que suelen presentarse en solo una copia. En *S. aureus* se han identificado transposones compuestos portadores de genes de resistencia a trimetoprim (Rouch et al., 1989), aminoglucósidos (Byrne et al., 1989) o vancomicina (Weigel et al., 2003).



Figura 8. Estructura de un transposón compuesto.

- **Transposones conjugativos:** se trata de elementos que tienen capacidad de excisión, transferencia conjugativa e integración en un nuevo genoma. Pueden contener un amplio rango de genes accesorios, entre ellos genes de resistencia. Un ejemplo de un transposón de este tipo en *S. aureus* es el Tn6014 el cual contiene el gen de resistencia a tetraciclina *tet(M)* (de Vries et al., 2009).
- **Transposones movilizables:** estos transposones pueden movilizarse gracias a la ayuda de otros elementos que codifican las proteínas necesarias para la formación de poros de conjugación.

9.1. EGMs que portan genes de resistencia en *S. aureus*

Se ha descrito la presencia de genes de resistencia en diferentes EGMs principalmente en plásmidos y transposones. En la siguiente **Tabla** se resumen los mecanismos de resistencia estudiados en esta tesis y se indican algunos de los EGMs en los cuales han sido identificados.

Tabla 8.- Antibióticos, lugares de acción, mecanismos de resistencia y localización de genes de resistencia en *Staphylococcus* spp.

Antibiótico	Lugar de acción	Mecanismo de resistencia ^a	Localización ^b	Referencia
β-lactámicos	PBP	I: <i>blaZ</i>	Tn(P)/Tn(C)	Olsen et al., 2006; Sidhu et al., 2002
		M: <i>mecA</i>	SCC <i>mec</i> (C)	Hansen et al., 2006
MLS	Subunidad 50S	M: <i>erm</i> (A/B/C/T/Y/TR), <i>cfr</i>	Plásmido Plásmido (C) Tn(P)/Tn(C)	Kadlec et al., 2010; Matsuoka et al., 2003; Ruiz de Gopegui et al., 2012; Thakker-Varia et al., 1987
		M: mutaciones ARNr 23S, L3, L4, L22	-	Meka et al., 2004; Mendes et al., 2010
		E: <i>msr</i> (A/B), <i>mef</i> (A/E), <i>erp</i> (B), <i>vga</i> (A/B/C/D/E), <i>lsa</i> (A/B/C)	Plásmido Tn(P)/Tn(C)	Kadlec et al., 2009; Haroche et al., 2002; Matsuoka et al., 2003; Schwendener et al., 2011
		I: <i>lnu</i> (A/B/C), <i>vat</i> , <i>vgb</i> , <i>mph</i> (C)	Plásmido	Allignet et al., 1999; Lüthje et al., 2007; Matsuoka et al., 2003

Tabla 8.- Continuación.

Antibiótico	Lugar de acción	Mecanismo de resistencia ^a	Localización ^b	Referencia
Linezolid	Subunidad 50S	M: mutaciones ARNr 23S, L3, L4, L22	-	Meka et al., 2004; Mendes et al., 2010
		M: <i>cfr</i>	Plásmido Plásmido (C)	Ruiz de Gopegui et al., 2012
Fenicoles	Subunidad 50S	I: <i>cat</i>	Plásmido	Schnellmann et al., 2006
		E: <i>efxA</i>	Tn(P)/Tn(C)	Kehrenberg et al., 2004; Kehrenberg et al., 2005
		M: <i>cfr</i>	Plásmido Plásmido (C)	Ruiz de Gopegui et al., 2012
Tetraciclinas	Subunidad 30S	E: <i>tet(K/L)</i>	Plásmido Plásmido (C)	Ruiz de Gopegui et al., 2012; Werckenthin et al., 1996
		M: <i>tet(M/O)</i>	Tn(C)	de Vries et al., 2009
Aminoglucósidos	Subunidad 30S	I: <i>aac(6')</i> -Ie- <i>aph(2'')</i> -Ia, <i>ant(4')</i> -Ia, <i>aph(3')</i> -IIIa, <i>ant(6)</i> -Ia	Plásmido Plásmido (C) Tn(P)/Tn(C)	Crameri et al., 1985; Gillespie et al., 1987; Ruiz de Gopegui et al., 2012
Quinolonas	ADN-girasa/ topoisomerasa IV	M: mutaciones en <i>griA</i> , <i>griB</i> , <i>gyA</i> , <i>gyrB</i>	-	Nakanishi et al., 1991
		A: mutaciones en <i>norA</i>	-	Nakanishi et al., 1991
Trimetoprim	DHFR	M: <i>dfSI/D/G/K</i>	Plásmido Tn(C)	Kadlec et al., 2009; Kadlec et al., 2010
Mupirocina	isoleucil-ARNt sintetasa	M: mutaciones en <i>ileS</i>	-	Cookson, 1998
		M: <i>mupA</i>	Plásmido Plásmido (C)	Cookson, 1998; Udo et al., 2003
Ácido fusídico	FE-G	M: mutaciones en <i>fusA</i>	-	McLaws et al., 2008; O'Neill et al., 2007
		M: <i>fusB/C/D</i>	Plásmido	McLaws et al., 2008; O'Neill et al., 2007
Glicopéptidos	Síntesis de la pared celular	M: <i>vanA</i>	Tn (P)	Zhu et al., 2008

^aI, Inactivación del antibiótico; M, Modificación de la diana; E, Expulsión activa; A, Alteración de la permeabilidad de la membrana o pared celular.

^bCuando entre paréntesis aparece una P es que el transposón se ha encontrado en un plásmido y si aparece una C es que el transposón o el plásmido se han integrado en cromosoma.

9.2. EGM que portan factores de virulencia en *S. aureus*

En la actualidad existe abundante información sobre los EGMs que portan factores de virulencia permitiendo que estos determinantes sean adquiridos por las bacterias hospedadoras en procesos de transferencia horizontal. A continuación, en la **Tabla 9** se detallan los determinantes de virulencia de *S. aureus* que son codificados por EGMs:

Tabla 9.- Factores de virulencia de *S. aureus* codificados por EGMs.

Factor de virulencia (gen)	EGM ^c	Referencia
Leucocidina de Panton Valentine (<i>lukF</i> -PV, <i>lukS</i> -PV)	φSa2mw, φPVL108, φSa2, φSa2USA300, φSLT, φPVL, φSLT-USA300_TCH1516, φtp310-1, φ2958PVL	Gillet et al., 2002; Voyich et al., 2006
Exfoliatina A (<i>eta</i>)	φETA, φETA2, φETA3	Kuroda et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002
Exfoliatina B (<i>etb</i>)	pETB, pRW001	Jackson et al., 1986; Yamaguchi et al., 2001
Exfoliatina D (<i>etd</i>)	vSAC (etdPI)	Yamaguchi et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002
Toxina del Síndrome del Shock Tóxico (<i>tst</i>)	SaPI1, SaPI2, SaPIbov1, SaPI3, SaPI _{n1/m1}	Plano, 2004; Ubeda et al., 2003; Kreiswirth et al., 1989; Lindsay et al., 1998
Enterotoxina A (<i>sea</i>)	φSa3, φ252B, φNM3, φMu50A	Baba et al., 2002
Enterotoxina A (<i>sea</i>)-Enterotoxina K (<i>sek</i>)-Enterotoxina Q (<i>seq</i>)	φSa3ms, φSa3mw	Holtfreter et al., 2007
Enterotoxina B (<i>seb</i>)	SaPI1, SaPI3, pZA10	Altboum et al., 1985; Baba et al., 2002; Frea et al., 1963
Enterotoxina C (<i>sec</i>)-Enterotoxina L (<i>sel</i>)	SaPIbov1, SaPI3	Avena et al., 1967; Baba et al., 2002
Enterotoxinas D (<i>sed</i>)-J (<i>sej</i>)- R (<i>ser</i>)	pIB485	Omoe et al., 2003
Enterotoxinas E (<i>see</i>)	φSa ^d	Couch et al., 1988
Enterotoxina G (<i>seg</i>)	φSa3	Baba et al., 2002
Enterotoxinas G (<i>seg</i>)-I (<i>sei</i>)-M (<i>sem</i>)-N (<i>sen</i>)-O (<i>seo</i>)	Operón <i>egc</i>	Jarraud et al., 2002

Tabla 9.-Continuación.

Factor de virulencia (gen)	EGM^c	Referencia
Enterotoxinas G (<i>seg</i>)-I (<i>sei</i>)-M (<i>sem</i>)-N (<i>sen</i>)-O (<i>seo</i>)-U (<i>seu</i>)	Operón <i>egc</i> -like	Letertre et al., 2003
Enterotoxina H (<i>seh</i>)- Δ Enterotoxina O (<i>seo</i>) ^a	SCC	Noto et al., 2006
Enterotoxina J (<i>sej</i>)-Enterotoxina R (<i>ser</i>) ^b	pF5	Omoe et al., 2003
Enterotoxina K (<i>sek</i>)	SaPI _{bov1} , SaPI1, SaPI5	Gillet et al., 2002; Yarwood et al., 2002
Enterotoxina L (<i>sel</i>)	SaPI1, SaPI _{n1/m1} , SaPI4	Novick et al., 2003; Ubeda et al., 2003; Chiang et al., 2006
Enterotoxina M (<i>sem</i>)	SaPI4	Baba et al., 2002
Enterotoxina P (<i>sep</i>)	ϕ N315, ϕ Mu50A	Brussow et al., 2004; Chiang et al., 2008
Enterotoxina Q (<i>seq</i>)	SaPI1, SaPI3, SaPI5	Yarwood et al., 2002
α -hemolisina (<i>hla</i>)	vSAc (etdPI)	Essmann et al., 2003; Highlander et al., 2007

^a Δ , la toxina *seo* se encuentra truncada.

^bEn este plásmido se han descrito dos nuevos genes *ses* y *set* (Ono et al., 2008).

^cIslas genómicas van precedidas por el símbolo v, las islas de patogenicidad estafilocócicas por Sa y los bacteriofagos por el símbolo ϕ .

^dSe ha sugerido que esta localizado en un profago.

Como resumen podemos decir que SARM es un patógeno de gran importancia en nuestros hospitales causante de múltiples brotes nosocomiales. Sin embargo, en los últimos años se está produciendo la emergencia de nuevas características epidemiológicas de este patógeno, como es la detección de variantes que se diseminan en el ámbito comunitario y la emergencia de la variante CC398 asociada a animales y que se trasfiere a personas en contacto con ellos. La nueva dimensión que está surgiendo entorno a SARM hace necesario la creación de grupos de trabajo interdisciplinares (que incluyan científicos y profesionales de la sanidad humana y animal) que estudien en profundidad los factores que están contribuyendo a la emergencia de las nuevas variantes y a su diseminación en diferentes ámbitos. Hasta el inicio de esta tesis, no existían trabajos que abordasen de forma global la emergencia y diseminación de la variante CC398 en distintos ecosistemas en España.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudiar casos clínicos causados por cepas SARM en pacientes relacionados con ganado porcino y determinar la posible transferencia de SARM CC398 del animal al hombre.
 - 1.1. Caracterizar genéticamente las cepas clínicas y estudiar el estado de portador nasal de pacientes y familiares.
 - 1.2. Determinar la prevalencia de SARM CC398 en los animales de las granjas y caracterizar genéticamente dichas cepas.
 - 1.3. Estudiar la dinámica de colonización nasal en personas en contacto con animales.
2. Determinar la prevalencia de SARM y de la línea genética CC398 en muestras alimentarias de origen animal.
3. Determinar la prevalencia de SARM y SARM en muestras nasales de voluntarios sanos y realizar su caracterización genética.
4. Caracterizar genéticamente cepas SARM de origen hospitalario y determinar las líneas genéticas circulantes y la posible emergencia de cepas CC398
5. Estudiar mecanismos de resistencia a antimicrobianos inusuales en cepas SARM CC398 y otros *Staphylococcus* spp y los sistemas de movilización.
6. Poner a punto un método de tipado de plásmidos para *S. aureus* y aplicarlo a cepas de diferentes orígenes, fenotipos de resistencia y líneas genéticas.

OBJETIVES

1. To study clinical cases caused by MRSA strains in patient related to farm animals and to determine the possible animal to human MRSA CC398 transmission.
 - 1.1. To characterize the clinical strains and to study the nasal carrier status of patients and relatives.
 - 1.2. To determine the prevalence of MRSA CC398 in farm animals related to the patients and to characterize the obtained strains.
 - 1.3. To study the dynamic of nasal colonization in people in close contact with pigs.
2. To determine the prevalence of MRSA and the presence of the variant CC398 in food samples of animal origin.
3. To determine the prevalence of MRSA and MSSA in nasal samples of healthy volunteers and to characterize the obtained strains.
4. To characterize MRSA strains in hospital settings and to determine the clonal lineages and the possible presence of CC398 strains.
5. To study unusual resistance mechanisms in MRSA CC398 strains and other staphylococci and to determine the involved mobilization systems.
6. To expand a previous plasmid classification system of gram-positive bacteria and to implement it with a collection of *S. aureus* strains of different origins, resistance phenotypes and clonal lineages.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS ESTUDIADAS

CASOS CLÍNICOS RELACIONADOS CON SARM CC398

Cepas clínicas

Durante un periodo de 3 años (1 de junio del 2008-1 junio del 2011) se estudiaron las cepas de *S. aureus* procedentes de pacientes del Hospital Royo Villanova de Zaragoza, con relación laboral con ganado porcino o que presentasen alguna característica que hiciese sospechar la presencia de SARM del linaje CC398. Dicho trabajo se realizó gracias a la colaboración con la Dra. Carmen Aspiroz, facultativo de Microbiología de dicho hospital. En este intervalo de tiempo se detectaron 7 casos clínicos distintos causados por cepas SARM de esta variante genética. Las muestras clínicas fueron procesadas en el Hospital Royo Villanova de Zaragoza y las cepas aisladas fueron posteriormente remitidas a la Universidad de La Rioja, donde fueron caracterizadas e incluidas en esta tesis.

Descripción de los casos clínicos

Caso clínico 1:

Una joven ecuatoriana de 12 años, quien vivía junto a una granja de cerdos, presentó una lesión cutánea en la barbilla (**Figura 9**). En un primer momento se pensó que se trataba de un caso de *Tinea*. Sin embargo, tras el análisis de las muestras tomadas, no se observaron dermatofitos y se descartó este diagnóstico. El único microorganismo que se aisló a partir de la lesión fueron dos cepas SARM, con diferentes características morfológicas (**Figura 9**). La infección desapareció tras el tratamiento tópico con mupirocina durante diez días. Ambas cepas SARM fueron incluidas en este trabajo (**Tabla 10**).



Figura 9. Foto de la izquierda: lesión cutánea en la barbilla de la paciente del caso clínico 1; foto de la derecha: dos cepas SARM con diferente morfología aislados de dicho caso clínico.

Caso clínico 2:

Varón de 54 años, trabajador de una granja de cerdos, presentó lesiones cutáneas que fueron diagnosticadas por el dermatólogo como psoriasis. Se tomaron tres muestras de las lesiones (cuero cabelludo, dorso de la nariz y barbilla) con el fin de determinar si existía sobreinfección bacteriana o fúngica. Tras el análisis microbiológico se detectó un alto crecimiento de SARM. Se trató al paciente con una solución de metilprednisolona y una crema con betametasona y ácido fusídico para las lesiones cutáneas, y un gel antiséptico para el cuero cabelludo y la barba. Aunque el paciente mejoró en las siguientes semanas, la infección persistió, y tres meses después fueron tomadas nuevas muestras del paciente (canal auditivo, barbilla y mano). Se aislaron 6 cepas clínicas SARM de este paciente que fueron incluidas en el estudio (**Tabla 10**).



Figura 10. Lesiones cutáneas del paciente: cuero cabelludo, conducto auditivo, mano.

Caso clínico 3:

Mujer de 45 años de edad, con antecedentes personales dermatológicos de eccema, presentó una lesión en el cuello, consistente en una placa eritematosa y pruriginosa. La paciente trabajaba en una granja de cerdos y tras el análisis microbiológico se aisló una cepa de SARM y dos meses después una cepa de SASM que fueron incluidas en el estudio (**Tabla 10**). Se trató la lesión con una pomada de mupirocina, desapareciendo.

Caso clínico 4:

Un trabajador de una granja de cerdos de 46 años consultó por una paroniquia intensa en varios dedos de las manos de largo tiempo de evolución. El paciente ya había sido tratado con anterioridad con antifúngicos tópicos y orales con resultados poco

satisfactorios. Se tomaron muestras y se obtuvo un cultivo abundante de estafilococos que se identificaron como SARM, además de diferentes especies de *Candida*. El paciente fue visitado en tres ocasiones para ver su evolución, y en cada una de ellas se recogieron muestras de sus lesiones. Se trató con una pomada de mupirocina y con fluconazol vía oral en pulsos una vez a la semana durante un mes. Casi un año después, el mismo paciente sufrió una nueva lesión de tórpida cicatrización en la cara, de varias semanas de evolución en la que también se identificó SARM. Nueve cepas clínicas SARM de este paciente fueron incluidas en el estudio (**Tabla 10**).

Caso clínico 5:

Una mujer de 48 años acudió al servicio de urgencias del hospital por presentar exudado ótico y dolor local. Entre sus antecedentes refería eccema de conducto auditivo externo de años de evolución. La paciente no tenía relación con ganado ni con animales domésticos, aunque su padre (con el que no convivía) sí que había sido granjero de cerdos hacía 10 años. Se detectó la presencia de SARM en la lesión y se le administró una pomada de mupirocina. Una cepa clínica SARM de esta paciente se incluyó en el estudio (**Tabla 10**).

Caso clínico 6:

Un trabajador de una granja de cerdos de 30 años de edad presentó una grave foliculitis en su cara. Con anterioridad ya había sido tratado con tetraciclina debido a una mala evolución del acné. Se tomaron muestras de las lesiones por raspado de la piel y punción folicular en ese momento y una semana después se identificaron cepas SARM en ambas tomas. Al mes siguiente, tras el tratamiento del paciente con mupirocina y ácido fusídico, ya no se detectó SARM y se constató una evidente mejoría en sus lesiones. Se incluyeron 2 cepas clínicas SARM de este paciente en el estudio (**Tabla 10**).

Caso clínico 7:

Un hombre de 79 años quien padecía una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) sufrió un empiema causado por SARM. El paciente, el cual ayudaba esporádicamente en una granja de cerdos, fue hospitalizado en la unidad de cuidados

intensivos (UCI). En Urgencias se le diagnosticó una trombosis venosa profusa íleo-femoral y se detectó un neumotórax derecho. También se observó la presencia de una masa tumoral con marcadores de cáncer de pulmón elevados. Se inició un drenaje torácico y se administró levofloxacina por vía intravenosa. Se sembraron muestras de líquido pleural y de broncoaspirado y en ambas se aisló SARM. El paciente no mejoró y se le cambió el antibiótico por linezolid pero su situación empeoró rápidamente y falleció. Se incluyeron 2 cepas clínicas SARM de este paciente en el estudio (**Tabla 10**).



Figura 11. Imagen radiográfica de tórax del paciente correspondiente al séptimo caso clínico

Cepas nasales de los pacientes y de sus familiares

Con el fin de conocer el estado de colonización nasal de los pacientes y de sus familiares o convivientes próximos, se tomaron muestras nasales de los mismos.

- Caso clínico 1: la paciente vivía con su familia (padre, madre y hermano) en el mismo recinto de una granja de cerdos donde trabajaban tanto el padre como la madre. Se tomaron muestras nasales de todos ellos.
- Caso clínico 2: el paciente trabajaba en una granja de cerdos. Se tomaron muestras de él y de su mujer y su hijo, quienes no tenían contacto con la explotación porcina.
- Caso clínico 3: la paciente era trabajadora de una granja de cerdos. Se tomaron muestras de ella y de su padre, madre y hermano.
- Caso clínico 4: el paciente y sus dos hermanos trabajaban en una granja de cerdos. Su padre estaba jubilado pero ayudaba esporádicamente. Se tomaron muestras nasales de todos ellos, así como también de la madre del paciente.

- Caso clínico 5: la paciente no tenía relación laboral con animales pero su padre había sido granjero de cerdos. Se tomaron muestras nasales de ambos, así como del marido de la paciente (sin ninguna relación con animales).
- Caso clínico 6: el paciente y su hermano trabajaban en una granja de cerdos. Se tomaron muestras de ambos y de sus padres, quienes no tenían relación laboral con animales.
- Caso clínico 7: el paciente ayudaba en una granja de cerdos donde sus dos hijos trabajaban. Se tomaron muestras de todos ellos y de su mujer.

Las muestras nasales de los pacientes y familiares fueron procesadas en el Hospital Royo Villanova de Zaragoza de manera similar a las muestras clínicas. Las cepas aisladas fueron remitidas a la Universidad de La Rioja.

Tabla 10.- Cepas de *S. aureus* aisladas de las muestras clínicas y de las muestras nasales de los pacientes y de sus familiares o convivientes en los 7 casos clínicos estudiados.

Caso clínico	Cepa	Persona muestreada	Tipo de muestra	Fecha aislamiento
1	C1570	Paciente	Barbilla	11 de junio 2008
	C1569	Paciente	Barbilla	11 de junio 2008
	C1571	Paciente	Nasal	17 de junio 2008
	C1577	Madre	Nasal	2 de septiembre 2008
	C1578	Madre	Nasal	2 de septiembre 2008
	C1574	Hermano	Nasal	17 de junio 2008
	C1576	Hermano	Nasal	2 de septiembre 2008
	C1572	Padre	Nasal	17 de junio 2008
2	C1676	Paciente	Barbilla	20 de octubre 2008
	C1677	Paciente	Dorso de la nariz	20 de octubre 2008
	C1675	Paciente	Cuero cabelludo	20 de octubre 2008
	C1870	Paciente	Canal auditivo	15 de enero 2009
	C1871	Paciente	Barbilla	15 de enero 2009
	C1872	Paciente	Mano	15 de enero 2009
	C1673	Paciente	Nasal	20 de octubre 2008
	C1674	Paciente	Nasal	20 de octubre 2008
	C1856	Paciente	Nasal	26 de diciembre 2009
	C1857	Paciente	Nasal	26 de diciembre 2009
	C1859	Paciente	Nasal	26 de diciembre 2009
	C1858	Paciente	Nasal	26 de diciembre 2009

Tabla 10.-Continuación.

Caso clínico	Cepa	Persona muestreada	Tipo de muestra	Fecha aislamiento
3	C1992	Paciente	Cuello	4 de junio 2009
	C2342	Paciente	Cuello	20 de julio 2009
	C1993	Paciente	Nasal	4 de junio 2009
	C2347	Madre	Nasal	6 de agosto 2009
	C2344	Hermano	Nasal	6 de agosto 2009
	C2345	Padre	Nasal	6 de agosto 2009
	C2346	Padre	Nasal	6 de agosto 2009
4	C2353	Paciente	Uña 3 derecha	28 de julio 2009
	C2349	Paciente	Uña 3 izquierda	28 de julio 2009
	C2352	Paciente	Uña 4 izquierda	28 de julio 2009
	C2366	Paciente	Uña 3 izquierda: 1 ^a revisión	20 de agosto 2009
	C2538	Paciente	Uña 3 izquierda: 2 ^a revisión	22 de septiembre 2009
	C2539	Paciente	Uña 3 derecha: 2 ^a revisión	22 de septiembre 2009
	C2768	Paciente	Uña 3 izquierda: 3 ^a revisión	14 de enero 2010
	C2782	Paciente	Uña 3 derecha: 3 ^a revisión	14 de enero 2010
	C2875	Paciente	Cara	16 de febrero 2010
	C2350	Paciente	Nasal	28 de julio 2009
	C2358	Padre	Nasal	13 de agosto 2009
	C2361	Madre	Nasal	13 de agosto 2009
	C2362	Madre	Nasal	13 de agosto 2009
	C2363	Hermano 1	Nasal	13 de agosto 2009
	C2364	Hermano 2	Nasal	13 de agosto 2009
	C2365	Hermano 2	Nasal	13 de agosto 2009
C2541	Paciente	Nasal	22 de septiembre 2009	
5	C2767	Paciente	Conducto auditivo	21 de enero 2010
	C2877	Padre	Nasal	3 de marzo 2010
6	C2878	Paciente	Cara	26 de febrero 2010
	C2895	Paciente	Cara	4 de marzo 2010
	C2897	Paciente	Nasal	4 de marzo 2010
	C2898	Hermano	Nasal	4 de marzo 2010
7	C2355	Paciente	Líquido pleural	22 de julio 2009
	C2354	Paciente	Bronco-aspirado	23 de julio 2009
	C2634	Paciente	Nasal	25 de julio 2009
	C2664	Hijo	Nasal	11 de diciembre 2009

Muestras nasales y cutáneas de los cerdos de las granjas:

Ante la sospecha del posible origen animal de las cepas SARM obtenidas de los pacientes y sus familiares, se decidió estudiar la prevalencia de animales portadores de SARM en las explotaciones ganaderas relacionadas en las que fue posible. Para ello se tomaron un total de 89 muestras nasales y/o cutáneas de los animales bajo la supervisión de la Dra. Carmen Aspiroz y los hisopos fueron remitidos a La Universidad de La Rioja, donde fueron procesadas siguiendo la metodología detallada más adelante para la detección y aislamiento de SARM. Posteriormente se caracterizaron genéticamente las cepas aisladas con el fin de determinar la posible transferencia de SARM del animal al hombre.

Dinámica de colonización nasal por SARM en personas en contacto con animales

Se llevó a cabo un estudio de dinámica de colonización en personas en contacto con animales tras ser tratadas con mupirocina para la descontaminación nasal de SARM. Para la realización de dicho trabajo se contó con la colaboración de la paciente y los familiares del caso clínico número 1. Se realizaron varias tomas durante meses y se aislaron 16 cepas SARM, todo ello, en el Hosp. Royo Villanova de Zaragoza. Estas cepas fueron remitidas a la Univ. de La Rioja e incluidas en este trabajo.

Tabla 11.- Cepas SARM nasales aisladas en el estudio de dinámica de la colonización.

Cepa	Persona muestreada	Fecha aislamiento
C1697	Paciente	Noviembre 2008
C1990	Paciente	Mayo 2009
C1657	Madre	Octubre 2008
C1658	Madre	Octubre 2008
C1660	Madre	Octubre 2008
C1694	Madre	Noviembre 2008
C1812	Madre	Diciembre 2008
C1813	Madre	Diciembre 2008
C1989	Madre	Mayo 2009
C2015	Madre	Mayo 2009

Tabla 11.- Continuación.

Cepa	Persona muestreada	Fecha aislamiento
C1661	Padre	Octubre 2009
C1662	Padre	Octubre 2008
C1698	Padre	Noviembre 2008
C1814	Padre	Diciembre 2008
C1815	Padre	Diciembre 2008
C1988	Padre	Mayo 2009

MUESTRAS DE ALIMENTOS

Durante el periodo de Noviembre del 2007 a Marzo del 2009 se estudiaron un total de 318 muestras de productos cárnicos de diferentes orígenes, todas ellas recogidas en la Comunidad de La Rioja. La mayor parte de las muestras (78,6%) se obtuvieron de carnicerías locales o fueron aportadas por cazadores particulares, el 21,4% restante se adquirieron en supermercados de grandes superficies comerciales.

El origen de las muestras cárnicas fue el siguiente: 148 pollo, 55 cerdo, 46 ternera, 18 cordero, 10 pavo, 8 conejo, 1 oveja, 12 carne picada (8 ternera+cerdo, 4 pollo+pavo), 20 de carne de caza (8 ave, 4 jabalí, 4 ciervo y 4 liebre) (**Figura 12**).

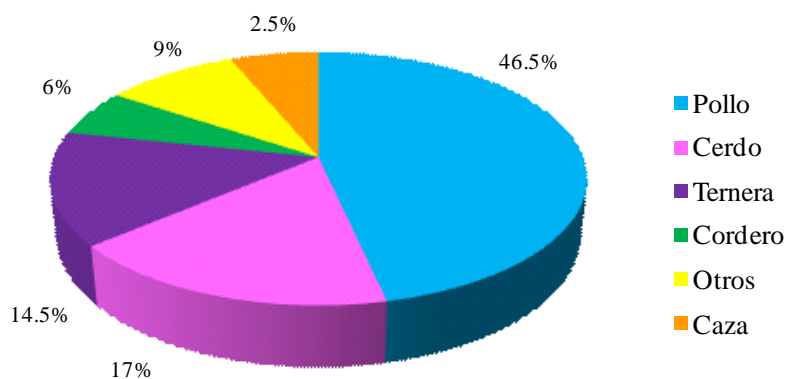


Figura 12. Distribución de las muestras recogidas en función de su origen animal. Otros incluye carne picada, conejo y pavo.

MUESTRAS NASALES DE PERSONAS SANAS

Se recogieron muestras nasales de 278 voluntarios sanos (165 mujeres y 113 hombres) durante el periodo de Abril a Diciembre del 2009 en la Comunidad de La Rioja. Ninguno de los individuos incluidos en el estudio presentaba factores de riesgo para ser portadores de SARM, no teniendo contacto con el sistema sanitario o con animales de granja. Su edad estuvo comprendida entre 1 y 74 años y todos ellos dieron su consentimiento informado para la participación en el estudio.

AISLAMIENTOS CLÍNICOS

Cepas SARM clínicas del Hospital San Pedro de Logroño

Se seleccionaron 204 cepas SARM del Hospital San Pedro de Logroño las cuales incluían 103 cepas aisladas en el periodo Enero-Junio del 2001, y 101 cepas aisladas en el periodo Enero-Abril del 2009. La prevalencia de SARM en los dos periodos estudiados fue del 29% en el 2001 y del 27% en el 2009. El criterio de selección de las cepas fue el de analizar aproximadamente las 100 primeras cepas obtenidas en ambos años. El origen de las cepas de cada uno de los años se muestra en la **Figura 13**. Dichas cepas fueron proporcionadas por la Dra. Inés Olarte, Facultativo de Microbiología del Hospital San Pedro de Logroño.

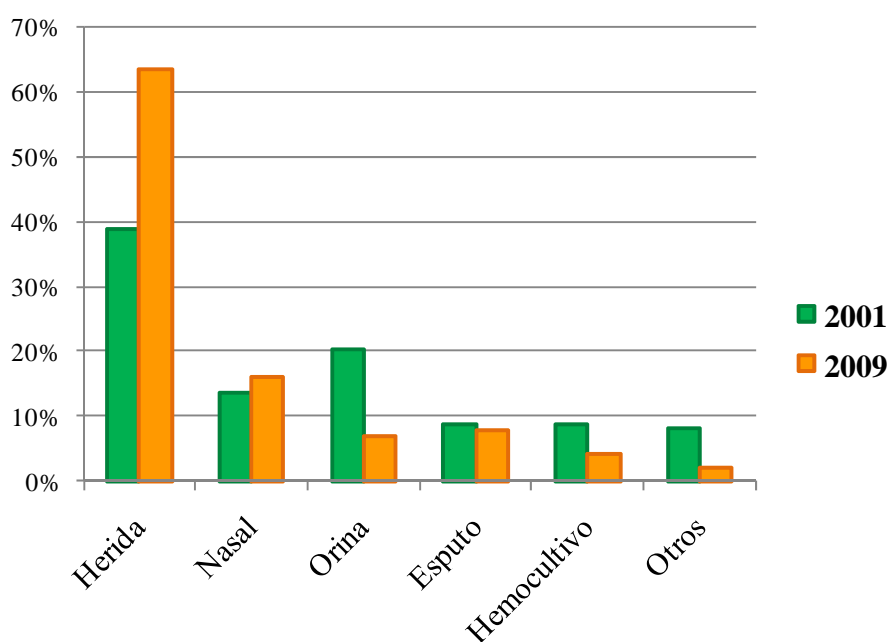


Figura 13. Origen de las cepas SARM obtenidas del Hospital San Pedro.

Cepas clínicas SARM-TET^R del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza

Durante los años 2009 y 2010 se detectaron un total de 58 cepas SARM resistentes a tetraciclina (TET^R) de pacientes diferentes en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Estas cepas representaron el 8,2% de todas las cepas SARM obtenidas durante esos dos años. De las 58 cepas, 52 fueron remitidas a la Universidad de La Rioja, gracias a la colaboración establecida con el Dr. Antonio Rezusta. Las cepas fueron caracterizadas para saber si se trataba de cepas SARM pertenecientes a la línea genética CC398. El origen de los aislados fue el siguiente (número de cepas): herida y exudado (20), aspirado (14), frotis nasal (11), sangre (5), líquido pleural (1) y orina (1) (**Figura 14**).

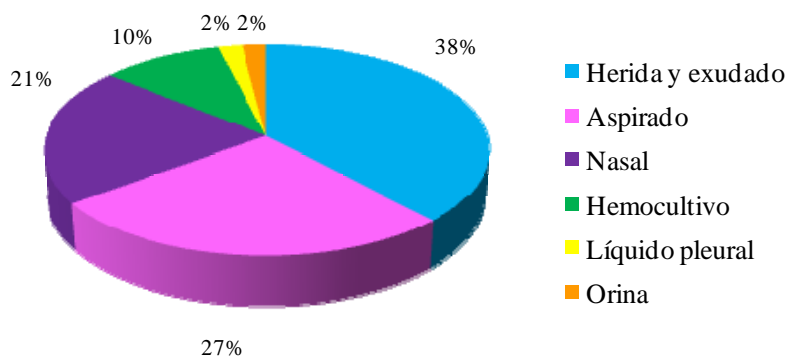


Figura 14. Origen de las cepas SARM-TET^R obtenidas del Hosp. Univ. Miguel Servet de Zaragoza.

OTRAS CEPAS DE *Staphylococcus* INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

Cepas con el fenotipo: resistencia a lincosamidas y sensibilidad a macrólidos

Con el fin de profundizar sobre los genes de resistencia responsables del fenotipo poco frecuente de resistencia a lincosamidas y sensibilidad a macrólidos, fueron incluidas en este trabajo 15 cepas de *Staphylococcus* spp. Dichas cepas provenían de distintos hospitales (Hosp. Royo Villanova y Hosp. Universitario Miguel Servet de Zaragoza; Hosp. San Pedro de Logroño; Hosp. General Universitario de Elche), de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y de la colección de cepas de la Universidad de La Rioja (**Tabla 12**).

Tabla 12.- Cepas de *Staphylococcus* spp. incluidas en este estudio por presentar el fenotipo de resistencia de lincosamidas y sensibilidad a macrólidos.

Cepa	Especie y resistencia a meticilina	Procedencia
C4128	SARM	Facultad de Veterinaria de Zaragoza
C5425	SARM	Hosp. San Pedro de Logroño
C2828	SASM	Hosp. General Univ. de Elche
C2829	SASM	Hosp. General Univ. de Elche
C5250	SARM	Hosp. Univ. Miguel Servet
C3036	SERM ^a	Univ. de La Rioja
C3937	SERM	Univ. de La Rioja
C2665	SESM ^b	Hosp. Royo Villanova de Zaragoza
C3897	SARM	Hosp. Royo Villanova de Zaragoza
C3898	SARM	Hosp. Royo Villanova de Zaragoza
C3899	SARM	Hosp. Royo Villanova de Zaragoza
C3900	SARM	Hosp. Royo Villanova de Zaragoza
C2825	SERM	Hosp. General Univ. de Elche
C2826	SERM	Hosp. General Univ. de Elche
C2827	SERM	Hosp. General Univ. de Elche

^aSERM, *S. epidermidis* resistente a meticilina.

^bSESM, *S. epidermidis* sensible a meticilina.

Cepas de origen animal de Dinamarca

Durante la estancia realizada en Dinamarca en el laboratorio del Dr. Frank M. Aarestrup en el National Food Institute (NFI) 49 cepas de *S. aureus* de origen porcino (27 SARM y 22 SASM) procedentes de la colección danesa fueron incluidas en el estudio de tipado de plásmidos. Estas cepas habían sido caracterizadas previamente y pertenecían a los complejos clonales (CC) 9, 30 y 398.

2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS Y AISLAMIENTO DE CEPAS

Muestras nasales de voluntarios sanos y nasales ó cutáneas de animales

Los hisopos de las muestras de voluntarios sanos y de los animales de las granjas relacionados con los casos clínicos fueron inoculados en medio BHI caldo (Difco) con 6,5% de cloruro sódico (Panreac). Se incubaron 24 horas a 37°C y

posteriormente 200 μ L del cultivo se sembró en placas de medio ORSAB (OXOID) suplementado con 2 mg/L de oxacilina para el aislamiento de SARM. En el caso de las muestras nasales de voluntarios sanos, también en placas de medio MSA (BD) para el aislamiento de SASM. Se incubaron durante 24-48 horas a 37°C. En aquellos casos en los que se detectó crecimiento positivo, se aislaron dos colonias por placa con apariencia de *S. aureus* (azules y amarillas, según si el medio era ORSAB o MSA, respectivamente) para su posterior identificación y estudio.

Muestras de alimentos

Para el detección y aislamiento de SARM a partir de los alimentos, se pesaron 0,3 g de cada muestra y se resuspendieron en 3 mL de solución salina estéril. A continuación 100 μ L de la suspensión se inocularon en 5 mL del medio BHI caldo con 6,5% de cloruro sódico. El resto del protocolo fue el mismo que el explicado en el párrafo anterior, empleándose en este caso sólo el medio ORSAB.

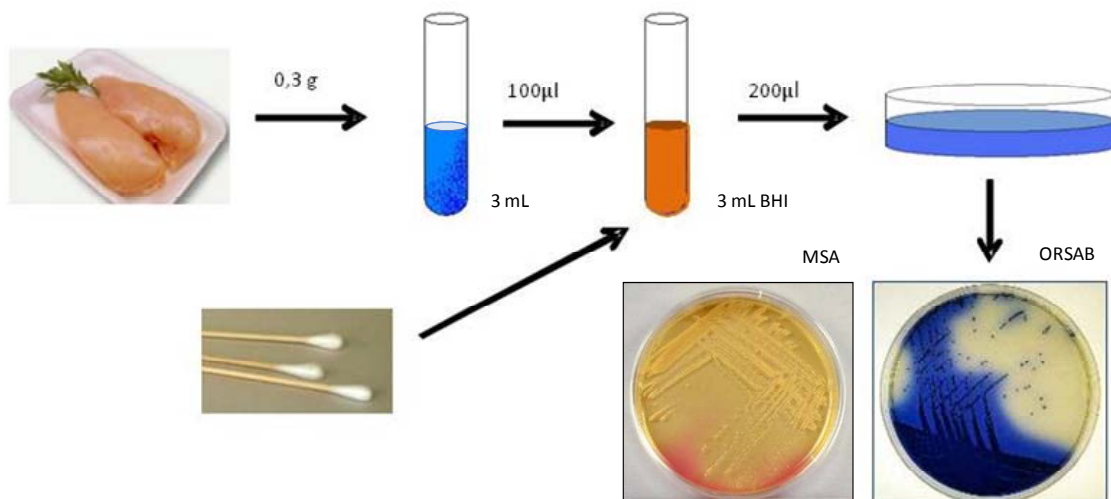


Figura 15. Método de aislamiento de SARM y SASM.

3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Las cepas de *S. aureus* aisladas a partir de los alimentos y de las muestras nasales de voluntarios y animales sanos, fueron identificadas mediante tinción Gram y mediante la prueba de la DNasa. Se seleccionaron las bacterias con morfología de cocos Gram positivos y aquellas cepas en las cuales apareció un halo alrededor del “botón” de crecimiento (**Figura 16**).



Figura 16. Placa de DNAsa tras la adición de ácido clorhídrico. La cepa de la parte superior es positiva y la cepa de la parte inferior negativa.

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, ampicilina, oxacilina, cefoxitina, tetraciclina, eritromicina, lincomicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, estreptomina, vancomicina, teicoplanina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, mupirocina, ciprofloxacina y ácido fusídico.

Para llevar a cabo esta técnica se partió de las cepas sembradas en medio sólido, BHI Agar (Difco), y crecidas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se preparó una suspensión de bacterias de una concentración 0,5 McFarland que se extendió, con ayuda de una torunda, sobre placas de Müller-Hinton (Difco) colocándose seguidamente los discos de antibiótico comerciales con una separación aproximada de 1 cm. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras las 24 horas de incubación se midió el halo de inhibición obtenido. Los resultados obtenidos se interpretaron siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011). Cuando eso no fue posible debido a que algunos antibióticos no son considerados en el CLSI se utilizaron los puntos de corte establecidos en otras fuentes [Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie (CA-SFM), Moreira de Oliveira et al., 2007].

Tabla 13.- Concentración de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por el CLSI para *S. aureus*.

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

Tabla 14.- Concentración 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	Concentración (µg)	Halo de inhibición (mm)		
		R	I	S
Estreptomina (STR)	10 unidades	<13	-	≥15
Ácido fusídico (FUS)	10	<19	-	≥23
Lincomicina (LIN)	15	<17	-	≥21

Tabla 15.- Concentración de los discos de antibiótico empleados y diámetro del halo de inhibición recomendados por Oliveira et al., 2007 para el estudio de sensibilidad a mupirocina en *Staphylococcus* spp.

Diámetro del halo de inhibición (mm)		Criterio interpretativo
Disco de 5 µg	Disco de 200 µg	
≥14	≥14	Sensible
-	≥14	Baja resistencia
-	-	Alta resistencia

Detección de resistencia inducible a clindamicina

Para la detección del fenotipo iMLS_B (resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y streptograminas B) se realizó el test del doble disco (D-test) (CLSI, 2011). 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 17. 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 antibiótico necesario para inhibir el crecimiento bacteriano se determinó por el método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2011). Los antibióticos testados fueron: oxacilina, cefoxitina, tetraciclina, lincomicina, clindamicina, eritromicina, virginiamicina, tiamulina, tobramicina, kanamicina, estreptomina, linezolid, cloranfenicol, vancomicina, teicoplanina, trimetoprim/ sulfametoxazol, ciprofloxacina y/o levofloxacina.

Se partió de los antibióticos en polvo y se preparó una disolución de trabajo de cada uno de ellos 10 veces mayor que la máxima concentración en placa deseada. A partir de esta disolución se realizaron diluciones seriadas a la mitad. Se añadieron a las placas petri 2 mL de cada una de las diluciones y 18 mL de MH agar. Se prepararon también placas sin antibiótico para usarlas como controles. Se preparó una suspensión de bacterias de 0,5 McFarland de las bacterias a estudiar y de las cepas control *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 29213. Esa suspensión fue diluida 1:10 y con 500 µL se llenaron los pocillos de un replicador Steers que se utilizó para sembrar las placas. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y se consideró como CMI, la concentración más baja de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo. El resultado se interpretó según los criterios del CLSI y según CA-SFM, Jones et al., 2002a y Vintov et al., 2003 para aquellos antibióticos cuyos puntos de corte no aparecían en dicho documento.

Tabla 16.- Criterios para los rangos de resistencia (R), resistencia intermedia (I) y sensibilidad (S) utilizados en este estudio.

Antibiótico	CMI (µg/mL)			Referencia
	R	I	S	
Oxacilina (OXA)	≤2	-	≥4	CLSI
Cefoxitina (FOX)	≤4	-	≥8	CLSI
Vancomicina (VAN)	≤2	4-8	≥16	CLSI
Teicoplanina (TEC)	≤8	16	≥32	CLSI
Gentamicina (GEN)	≤4	8	≥16	CLSI
Kanamicina (KAN)	≤16	32	≥64	CLSI
Tobramicina (TOB)	≤4	8	≥16	CLSI
Estreptomina (STR)	≤8	-	>16	CA-SFM
Tetraciclina (TET)	≤4	8	≥16	CLSI
Ciprofloxacina (CIP)	≤1	2	≥4	CLSI
Levofloxacino (LEV)	≤1	2	≥4	CLSI
Eritromicina (ERI)	≤0,5	1-4	≥8	CLSI
Clindamicina (CLI)	≤0,5	1-2	≥4	CLSI
Lincomicina (LIN)	≤2	-	>8	CA-SFM
Tiamulina (TIA)	≤4	-	-	Jones et al., 2002a
Virginiamicina (VIR)	-	-	≥8	Vintov et al., 2003
Linezolid (LZD)	≤4	-	≥8	CLSI
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	≤2/38	-	≥4/76	CLSI
Cloranfenicol (CLO)	≤8	16	≥32	CLSI

4.3. Determinación de la CMI mediante el uso de placas Sensititre^R DKVP

La CMI fue determinada en el caso de las 49 cepas de *S. aureus* de origen animal de Dinamarca mediante la utilización de placas Sensititre^R DKVP. Estas placas incluyen los antibióticos penicilina, cefoxitina, tetraciclina, eritromicina, tiamulina, gentamicina, estreptomina, trimetoprim, sulfametoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, florfenicol, espectinomicina, ciprofloxacina. Se partió de la suspensión bacteriana a 0,5 McFarland, se sembró en las placas y se incubó a 37°C durante 18 horas. Se consideró como CMI, la concentración más baja de antibiótico en la cual apareció un botón en el fondo del pocillo.

5. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizaron diversas técnicas para la extracción del ADN total y plásmidico.

5.1. ADN total:

Se utilizaron tres métodos para la extracción de ADN total utilizado para la realización de PCRs. El método 1 se empleó en la Univ. de La Rioja, el método 2 en el National Food Institute de Dinamarca y el método 3 se utilizó en el estudio de entornos genéticos.

Método 1:

Método de extracción con lisostafina y proteinasa K.

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

Método 2:

Método de hervido con PBS y TE.

1. Se sembraron las cepas en placas de agar sangre (BD) durante 24 horas a 37°C.
2. Se tomó una colonia aislada de cada una de ellas y se suspendió en 1 mL de PBS.
3. Se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 5 min.
4. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 100 µL de tampón TE (10:1).
5. Se incubó durante 10 min a 100°C, se enfrió en hielo y se almacenó a 4°C.

Método 3:

Extracción mediante el kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)”.

Se siguieron las instrucciones del fabricante.

5.2. ADN plasmídico:

En aquellos casos en que se quería estudiar un plásmido portador de un gen de resistencia concreto, y para evitar su pérdida, se añadió antibiótico al medio en el cual se creció la bacteria.

Método 1:

Extracción con el kit comercial “Qiagen plasmid purification midi kit” (Qiagen).

Se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Método 2:

Extracción con lisostafina.

1. Se incubó una colonia en 3 mL de LB caldo a 37°C durante 24 horas.
2. Se transfirió 1,5 mL a un eppendorf estéril y se centrifugó a 7000 r.p.m. durante 10 min a 4°C.
3. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 µL del tampón P1 del kit de Qiagen-

4. Se añadió 6 μL de lisostafina (1800 U/mL), se vortió y se incubó 30 min a 37°C.
5. Se añadió 200 μL del tampón P2 del kit de Qiagen y se mezcló.
6. Se dejó 5 min en hielo.
7. Se añadió 150 μL del tampón Minisilato III (3 M acetato sódico, pH 4,8) y se invirtieron los tubos de 2 a 3 veces.
8. Se dejó 10 min en hielo.
9. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 30 min. Durante este tiempo se prepararon tubos eppendorf con 1 mL de etanol 100% y se guardaron en el congelador (-20°C).
10. Se transfirió el sobrenadante a los tubos eppendorf con etanol y se invirtieron los tubos 14 veces.
11. Se dejó 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 30 min.
12. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 500 μL de etanol 80% previamente enfriado.
13. Se centrifugó directamente a 13000 r.p.m. durante 10 min.
14. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta pasteur y se dejó secar los tubos en papel absorbente.
15. Se resuspendió el pellet con 30 μL de agua miliQ estéril y se almacenó a -20°C.

- **Cuantificación del ADN**

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro y el programa informático de cuantificación 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 este trabajo, esta técnica se utilizó para la identificación de especies de estafilococos, tipado molecular, detección de mecanismos de resistencia y virulencia, estudio de entornos genéticos y elaboración de sondas para hibridación.

Para llevar a cabo la técnica 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 necesitase secuenciar posteriormente el producto de PCR obtenido.

Tabla 17.- 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	1 μL	0,5 μM
Cebador reverse ¹	25 μM	1 μL	0,5 μM
Tampón de reacción NH_4 (Bioline)	10X	5 μL	1X
MgCl_2 (Bioline) ²	50 mM	1,5 μL	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	2,5 mM	1 μL	2 mM
BioTaq DNA polimerasa (Bioline) ³	5 U/ μL	0,3 μL	0,03 U/ μL
ADN	---	10 μL	---
Agua miliQ estéril	---	Hasta 50 μL	---

¹Los cebadores utilizados en este estudio fueron sintetizados por Sigma Aldrich.

²Se empleó 2 μL de MgCl_2 en las PCR múltiples (con más de un par de cebadores).

³Se empleó 0,5 μL de BioTaq en aquellas PCR con fragmentos superiores 2000 pb.

Cuando los fragmentos que se querían amplificar tenían un tamaño superior a 3000 pb y resultaban negativos al intentar amplificarse con Biotaq DNA Polimerasa

(Bioline), se utilizó la enzima Taq-Takara DNA Polimerasa (TakaRa LA Taq™, Takara Bio Inc.).

Tabla 18.- 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
Cebador forward	25 µM	1 µL	0,5 µM
Cebador reverse	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	---	20 µL	---
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 (94°C, 1 min); 30 ciclos (98°C, 5 seg y 68°C, 15 min) y elongación final (72°C, 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 visualizar los fragmentos amplificados por PCR se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa. Se trata de una técnica de rutina en laboratorios de genética y biología molecular que permite separar fragmentos de ADN de distinto tamaño, gracias a la acción de un campo eléctrico.

Para preparar el gel, se utilizó una concentración de agarosa D-1 (Pronadisa, Conda) en un rango de 0,8-2,5% peso/volumen (mayor porcentaje cuanto menor es el

tamaño de las bandas esperadas o más próximas están entre sí) preparado con tampón TBE 1X (TBE 5X: 54 g/L Tris(hidroximetil)aminometano (Panreac); 27,5 g/L ácido bórico (Panreac); 20 mL EDTA 0,5 M (Panreac) [pH 8]). Para poder visualizar los fragmentos de ADN se añadió bromuro de etidio (BioRad) en una concentración final de 0,5 µg/mL.

Se cargaron 10 µL del producto de PCR y 2 µL de tampón de carga (40% (peso/volumen) sacarosa; 0,25% (peso/volumen) azul de bromofenol; 0,25% (peso/volumen) xileno cianol) y un marcador de tamaño: 100 Base-Pair Ladder (New England, bioLabs), Hyperladder IV (Bioline) o Lambda/Hind III Marker (Stratagene) (en función de los tamaños esperados de los amplicones).

Se sometió a un campo eléctrico de 75-100 V durante 0,75-2 horas (más tiempo si los fragmentos son pequeños o están más próximos entre sí). Se visualizó el gel con luz ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes (Image Store 5000, UVP) gracias al programa informático ChemiGenius (GenSnap de SynGene).

8. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ESTAFILOCOCOS

Además de las pruebas de identificación (tinción de Gram y método de la DNAsa) se utilizó la técnica de la PCR para la identificación de las cepas incluidas en este estudio. Para la confirmación de las cepas SARM se llevó a cabo una PCR múltiple para la detección de los genes: *nuc* (específico de *S. aureus*) y *mecA* (gen codificante de la PBP2a responsable de la resistencia a meticilina). Se utilizó, además, una región del ARNr 16S como control interno (Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance, 2009).

Tabla 19.- Secuencia de cebadores empleados para la identificación de SARM.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>nuc</i>	886 pb
F: TCAGCAAATGCATCACAAACAG	
R: CGTAAATGCACTTGCTTCAGG	
<i>mecA</i>	527 pb
F: GGGATCATAGCGTCATTATTC	
R: AACGATTGTGACACGATAGCC	
ARNr 16S	255 pb
F: GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	
R: AGACCCGGGAACGTATTCAC	

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

Para la identificación de *S. epidermidis* y *S. sciuri* se emplearon PCRs específicas para dichas especies (**Tabla 20**). Para otras especies se amplificó y secuenció una región del ARNr 16S.

Tabla 20.- Secuencia de cebadores empleados para la identificación de otras especies de *Staphylococcus* spp. y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones			Referencia (tamaño del amplicón)
<i>S. sciuri</i>	94°C	5 min	1 ciclo	Yasuda et al., 2002 (844 pb)
F: GAACCGCATGGTTCAATAG				
R: GACTCTATCTCTAGAGCGG	94°C	1 min		
	55°C	1 min	25 ciclos	
	72°C	2 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>S. epidermidis</i>	95°C	5min	1 ciclo	Park et al., 2008 (125 pb)
F: ATCAAAAAGTTGGCGAACCTTTT	95°C	1min		
R: CAAAAGAGCGTGGAGAAAAGTATC	51°C	1min	40 ciclos	
	72°C	1min		
	72°C	8min	1 ciclo	
<i>16S universal</i>	95°C	5min	1 ciclo	Este estudio (1400-1500 pb)
F: AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	95°C	1min		
R: GGYTACCTTGTTACGACTT	52°C	1min	32 ciclos	
	72°C	2min		
	72°C	7min	1 ciclo	

9. TIPADO MOLECULAR

9.1. Tipado del SCCmec

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. Esta técnica se empleó en todas las cepas de estafilococos resistentes a meticilina. Los cebadores y condiciones de PCR empleados aparecen en la **Tabla 21**.

Tabla 21.- Secuencia de cebadores empleados para la determinación del casete cromosómico estafilocócico *mec* (*SCC _{mec}*) y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>ccrA1-ccrB</i> F: AACCTATATCATCAATCAGTACGT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	94°C 2min 1 ciclo	Kondo et al., 2007 (695 pb)
<i>ccrA2-ccrB</i> F: TAAAGGCATCAATGCACAAACACT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	94°C 2min 57°C 1min 30 ciclos 72°C 3min	Kondo et al., 2007 (937 pb)
<i>ccrA3-ccrB</i> F: AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	72°C 7min 1 ciclo	Kondo et al., 2007 (1791 pb)
<i>ccrA4-ccrB4</i> F: TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT R: AGAAAAGATAGAAGTTCGAAAGA	94°C 2min 1 ciclo 94°C 2min 57°C 1min 30 ciclos 72°C 3min 72°C 7min 1 ciclo	Kondo et al., 2007 (1287 pb)
<i>ccrC</i> F: CACTTAATCCATGTACACAG R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA	94°C 5min 1 ciclo 94°C 1min 50°C 1min 30 ciclos 72°C 2min 72°C 10min 1 ciclo	Witte et al., 2007 (336 pb)

Tabla 21.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>mecA-mecI</i> F: CATAACTTCCCATTCTGCAGATG R: ATATACCAAACCCGACAACACTACA	94°C 2,5 min 1 ciclo	Kondo et al., 2007 (1963 pb)
<i>mecA-IS1272</i> F: ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG R: ATATACCAAACCCGACAACACTACA	94°C 2min 60°C 1min 30 ciclos 72°C 3min	Kondo et al., 2007 (2827 pb)
<i>mecA-IS431</i> F: TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT R: ATATACCAAACCCGACAACACTACA	72°C 7min 1 ciclo	Kondo et al., 2007 (804 pb)
SCC<i>mec I</i> F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R: GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	94°C 5min 1 ciclo	Zhang et al., 2005 (613 pb)
SCC<i>mec II</i> F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC	94°C 45seg 65°C 45seg 10 ciclos 72°C 1,5min	Zhang et al., 2005 (398 pb)
SCC<i>mec III</i> F: CCATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	72°C 7min 1 ciclo 94°C 45seg 55°C 45seg 25 ciclos 72°C 1,5min	Zhang et al., 2005 (280 pb)
SCC<i>mec IVa</i> F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	72°C 10min 1 ciclo	Zhang et al., 2005 (776 pb)

Tabla 21.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
SCCmec IVb		Zhang et al., 2005
F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC		(493 pb)
R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	94°C 5min 1 ciclo	
	94°C 45seg	
SCCmec IVc	65°C 45seg 10 ciclos	Zhang et al., 2005
F: ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC	72°C 1,5min	(200 pb)
R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG	72°C 7min 1 ciclo	
SCCmec IVd		Zhang et al., 2005
F: CTCAAATACGGACCCCAATACA	94°C 45seg	(881 pb)
R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	55°C 45seg 25 ciclos	
	72°C 1,5min	
SCCmec V		Zhang et al., 2005
F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG	72°C 10min 1 ciclo	(325 pb)
R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC		
SCCmec IVNv		Sola et al., 2012
F: GCCAATCGCTTAATTGGAGCCG	94°C 2,5 min 1 ciclo	(708 pb)
R: ACTTCATCTTCCCAAGGCTCTGT	94°C 2min	
F: TGGCCATCACGTGTTCTGGG	52°C 1min 30 ciclos	(948 pb)
R: TCGGATGTCTGTCCGAGGACT	72°C 3min	
F: ACCAAACCCGACA ACTACA ACTAT	72°C 7min 1 ciclo	(1297 pb)
R: GTGTCGTAAAGCTGCGCTCA		

9.2. Tipado de la región polimórfica del gen *spa*

Se caracterizaron genéticamente todas las cepas de *S. aureus* 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 22**). Para el análisis de la región amplificada se utilizó el programa “Ridom Staph-Type” versión 1.5.21 (Ridom GmbH), el cual de manera automática detecta las diferentes repeticiones y asigna un tipo de *spa*.

Tabla 22.- Secuencia de cebadores empleados para el tipado del gen *spa* y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones			Referencia (tamaño del amplicón)
<i>spa</i>	80°C	5min	1 ciclo	Harmsen et al., 2003
F: AGACGATCCTTCGGTGAGC	94°C	45seg		(variable)
R: GCTTTTGCAATGTCATTTACTG	60°C	45seg	35 ciclos	
	72°C	1,5 min		
	72°C	10min	1 ciclo	

9.3. Tipado del locus *agr*

Todas las cepas de *S. aureus* 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. Para ello se realizaron dos PCRs dobles. En la primera PCR se amplificaron 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 23**.

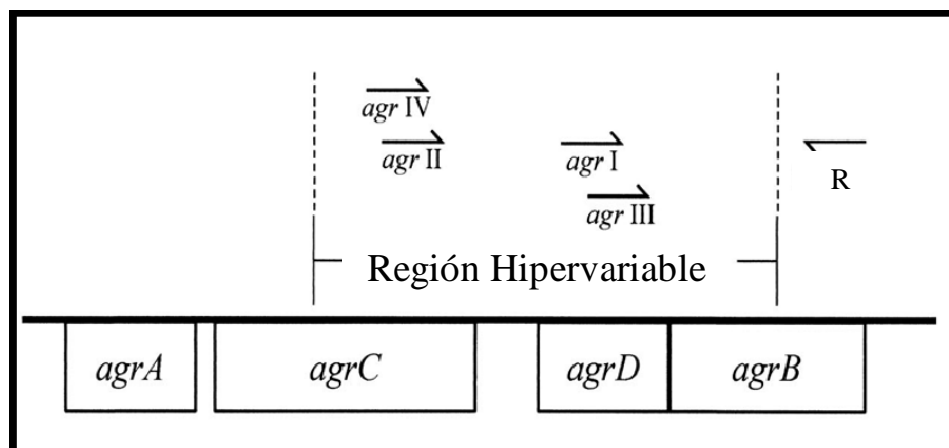


Figura 18. Representación del locus *agr* con la localización de los cebadores utilizados para la amplificación de la región hipervariable que delimita los diferentes grupos. El cebador pan *agr* fue el cebador reverse utilizado para la detección de los cuatro tipos de locus *agr* (modificada de Shopsin et al., 2003).

Tabla 23.- Secuencia de cebadores empleados para el tipado de *agr* y condiciones de amplificación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>agr I</i> F: GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT R: ATGCACATGGTGCACATGC	94°C 5min 1 ciclo 94°C 15seg 55°C 30seg 30 ciclos	Shopsin et al., 2003 (440 pb)
<i>agr II</i> F: GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC R: ATGCACATGGTGCACATGC	72°C 2min 72°C 7min 1 ciclo	Shopsin et al., 2003 (572 pb)
<i>agr III</i> F: CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC R: ATGCACATGGTGCACATGC	94°C 5min 1 ciclo 94°C 15seg 55°C 30seg 30 ciclos	Shopsin et al., 2003 (406 pb)
<i>agr IV</i> F: CGATAATGCCGTAATACCCG R: ATGCACATGGTGCACATGC	72°C 2min 72°C 7min 1 ciclo	Shopsin et al., 2003 (656 pb)

9.4. Tipado según Multilocus Sequence Typing (MLST)

Para llevar a cabo esta técnica se amplificaron por PCR fragmentos internos de genes constitutivos (“housekeeping”) que presentan mayor similitud a mayor cercanía evolutiva. Posteriormente los fragmentos obtenidos fueron secuenciados y analizados para comprobar el alelo de cada uno de los genes. Según la combinación de los alelos se estableció el Sequence Type (ST) al que pertenecían. Todo ello fue comparado con la base de datos de www.mlst.net. Además, gracias al programa informático eBurst v3, se estableció a que Complejo Clonal (CC) pertenecían los STs obtenidos.

- *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* (triosafosfato isomerasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (Enright et al., 2000).

Tabla 24.- Secuencia de cebadores empleados para el MLST de *S. aureus*.

Gen	Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>arcC</i>	F: TTGATTCACCAGCGGTATTGTC R: AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456 pb
<i>aroE</i>	F: ATCGGAAATCCTATTTACATTC R: GGTGTTGTATTAATAACGATATC	456 pb
<i>glpF</i>	F: CTAGGAACTGCAATCTTAATCC R: TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465 pb
<i>gmk</i>	F: ATCGTTTTATCGGGACCATC R: TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429 pb
<i>pta</i>	F: GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R: GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	474 pb
<i>tpi</i>	F: TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA R: TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402 pb
<i>yqiL</i>	F: CAGCATAACAGGACACCTATTGGC R: CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516 pb

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

- *S. epidermidis*

El tipado por MLST de las cepas de *S. epidermidis* se realizó mediante el análisis de 7 genes constitutivos: *arcC* (carbamato quinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *gtr* (transportador ABC), *mutS* (proteína reparadora de errores del ADN), *pyrR* (proteína reguladora del operón pirimidina), *tpiA* (triosafosfato isomerasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (Thomas et al., 2007).

Tabla 25.- Secuencia de cebadores empleados para el MLST de *S. epidermidis*.

Gen	Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>arcC</i>	F: TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG R: TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG	465 pb
<i>aroE</i>	F: CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC R: CAAGCGAAATCTGTTGGGG	420 pb
<i>gtr</i>	F: CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT R: GTGATTAAAGGTATTGATTTGAAT	438 pb
<i>mutS</i>	F: GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA R: GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT	412 pb
<i>pyrR</i>	F: GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT R: GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA	428 pb
<i>tpiA</i>	F: ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC R: TTAATGATGCGCCACCTACA	424 pb
<i>yqiL</i>	F: CACGCATAGTATTAGCTGAAG R: CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA	416 pb

Las condiciones de amplificación fueron las mismas para cada uno de los siete genes: desnaturalización inicial (95°C, 3 min); 34 ciclos (95°C, 30 seg; 50°C, 1 min y 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 10 min).

9.5. Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)

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

Cepas. Partiendo de un cultivo puro en placas de BHI agar (Difco), se inoculó 1 mL de BHI caldo (Difco) con una única colonia y se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente, se centrifugó 200 µL de la suspensión bacteriana a 13000 r.p.m. durante 2 min y decantando, 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 50°C. 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 37°C 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 proteólisis (EDTA 0,5 M pH 9,5, sarcosyl 1% y proteinasa K 50 µg/mL). Se dejó en agitación a 56°C un mínimo de 4 horas.

Lavados. Se eliminó la solución de proteólisis 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 °C. Los insertos se aguardaron a 4°C, para próximas aplicaciones.

Digestión enzimática. Se utilizaron dos enzimas para la digestión de los insertos. En el caso de cepas de *S. aureus* no pertenecientes al CC398 y de cepas de *S. epidermidis* se empleó la enzima *SmaI*. Para las cepas de *S. aureus* CC398 se utilizó la enzima *XmaI* debido a que estas cepas presentan una metilación en residuos de adenina y citosina que impide el corte por parte de *SmaI* (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 *SmaI* o de la enzima *ApaI* (New England Biolabs), 1 µL de BSA 0,1% (en el caso de *XmaI*), 10 µL del tampón “NEBuffer 4” 1X de la enzima y agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Se incubó en el baño a 25°C (*SmaI*) o 37°C (*ApaI*) 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 Middle Range PFG Marker (New England Biolabs). Se colocaron los insertos correspondientes en el resto de carriles y se sellaron con agarosa a 50°C. 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 *SmaI* fueron: 6 V/cm² con pulsos de 5 a 50, a una temperatura de 14 °C durante 22 horas. En el caso de la enzima *ApaI* 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. Trascurrido el tiempo de tinción se visualizó el gel con luz ultravioleta. Según el resultado obtenido se destiñó con agua destilada tantas veces como fuese oportuno 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 “de visu” 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 considero aquellos patrones que se distinguiesen por tres o menos bandas.

10. TIPADO DE PLÁSMIDOS

Se quiso conocer el contenido plasmídico de una colección de cepas de *S. aureus*. Para ello lo primero que se hizo fue poner a punto un sistema de clasificación de plásmidos para su utilización en cepas de esta especie. Se partió de un sistema previamente desarrollado para plásmidos de *Enterococcus* spp. y otras bacterias Gram positivas (Jensen et al., 2010). Este sistema se basaba en regiones conservadas de los genes *rep*, codificantes de proteínas de iniciación de la replicación. Para llevar a cabo este trabajo se realizó una estancia en el grupo del Dr. Aarestrup en el National Food Institute (Dinamarca).

Se analizaron todas las secuencias de plásmidos de *S. aureus* presentes en la base de datos del GenBank mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas y se agruparon en diferentes familias *rep* y secuencias únicas (SUs). Posteriormente se diseñaron cebadores para las nuevas familias *rep* y SUs definidas y se utilizaron, junto con los cebadores ya descritos en el anterior trabajo (Jensen et al., 2010), para el estudio de 92 cepas de *S. aureus*.

Los cebadores utilizados para la detección de las familias *rep* y *SUs* se muestran en la **Tabla 26**.

Tabla 26.- Cebadores empleados en el estudio de clasificación de plásmidos: familia *rep*, plásmido de referencia, tamaño, temperatura de hibridación de cebadores, secuencia de los cebadores y referencia.

Familia <i>rep</i> ^a	Plásmido	Tamaño	T ^b	Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
1	pIP501	624 pb	56°C	TCGCTCAATCACTACCAAGC CTTGAACGAGTAAAGCCCTT	Garcia-Migura et al., 2007
2	pRE25	630 pb	56°C	GAGAACCATCAAGGCGAAAT ACCAGAATAAGCACTACGTACAATCT	Garcia-Migura et al., 2007
3	pAW63	403 pb	52°C	CCTAATGTATATAATTTTGGTACATAT ACATTTTCTCAAAGAACAT	Jensen et al., 2010
4	pMBB1	430 pb	52°C	ACTATGTCGTTGAGTCTAATGACT AGCAAGATAGAATATTTACTTTTAAGTTT	Garcia-Migura et al., 2007
5 ampliada	pSAS	257 pb	50°C	CTTAAATCTACMTATTCWAAAMAYATGTT TCARCGTCAAAGWTRAACCTCT	Este estudio-BX571858
6	pS86	551 pb	56 °C	ACGAATGAAAGATAAAGGAGTAG TAAATTCTAGTTTGGCAATCTTAT	Garcia-Migura et al., 2007
7	pUSA02	227 pb	52°C	AGACGTAATATGCGTRTTGA CCAAAATAYTTYGTTTCTGG	Jensen et al., 2010
7b	pC223	729 pb	56°C	CTAATAGCCGGTTAGACGCAC GACGRGARTTTCTATGTAATTCTCC	Este estudio-NC_005243.1
8	pAM373	394 pb	56°C	TAGATACGACAAAAGAAGAATTACA CCAATCATGTAATGTTACAACC	Garcia-Migura et al., 2007
9	pCF10	201 pb	56°C	GCTCGATCARTTTTCAGAAG CGCAAACATTTGTCWATTTCTT	Garcia-Migura et al., 2007
10	pDLK1	382 pb	56°C	TATAAAGGCTCTCAGAGGCT CCAAATTCGAGTAAGAGGTA	Jensen et al., 2010
10b	pSK6	200 pb	52°C	TAAATAAAGACTCAGGAGAAGTA TAGCAAGTTCTCGAACTGTT	Este estudio-U96610.1
11	pEF1071	500 pb	52°C	TCTAGAATGCGTAAAAAGG CCTTTGAAGATWGCRGTWAG	Jensen et al., 2010
12	pBMB67	470 pb		GAGCCTATAACAGAGTACACA CAAATATAGGCTTTGTAGTTC	Jensen et al., 2010
13	pC194	402 pb	52°C	ATGATGCAATATATTAAGCA TACCAGAATAYTTAGCCATTTT	Jensen et al., 2010
14	pRI	164 pb	52°C	GAAAGYTRGATAGYTTTGC RTTTTGRCTTTCTTSYTTCA	Jensen et al., 2010
15	pUSA03	327 pb	52°C	CAGTAGAAGAAAATTATAAAGAAC GTTATGGCTGGTTTTAATAAA	Jensen et al., 2010
16	pSAS	592 pb	52°C	CAGGAAAACACTTCGTTTAT CTTCTATATCACTATCATTGTCATT	Jensen et al., 2010
17	pRUM	604 pb	52°C	TACTAAGTGTGGTAATTCGTTAAAT ATCAAGGACTCAACCGTAATT	Garcia-Migura et al., 2007

Tabla 26.- Continuación.

Familia <i>rep</i>^a	Plásmido	Tamaño	T^b	Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
18	pEF418	462 pb	56°C	ACACCAGTCGAAATGAATTT AGGAATATCAAGTAATTCATGAAAGT	Garcia-Migura et al., 2007
19	pUB101	543 pb	52°C	GWGATCGCTTARAYTTATCTAT YMTTGTSTGGMAATTCTT	Jensen et al., 2010
20	EDINA	329 pb	52°C	CTGTGAATYTGGAAGTTCC CTAAATATTTTRTTYGAAGATGC	Este estudio-AP003089
21	pBMSa1	414 pb	50°C	TAGTTATCAAGCTCARARAG GMTTSWATRTCTTTATCGCC	Este estudio-AY541446.1
22	pUB110	486 pb	56°C	TCCGTTCCCAATTCCACATTGCAA TGCGTGCAACGGAAGTGACA	Este estudio-X03408.1
23	pV030-8	293 pb		TGGTCGTGACGCACATTACACA CGCTATTTTCTCCGTATCCGG	Este estudio-EU366902.1
24	pWBG745	229 pb		TCACAGAACTTCAAGAATTCCC CCTTGCATAGTYTCAACACTTTC	Este estudio- GQ900389.1
SU	pMG1(pHTβ)	199 pb	52°C	GTATTAACACACTGGACTC TCAGTGTAGGCAATAACCC	Jensen et al., 2010
SU	pE194	303 pb	54°C	GTGTCCATTGTCCATTGTCC GCATGCCAGTGCTGTCTATC	Este estudio-M17811.1
SU	pKKS825	320 pb		AAGCAATGGCGAACAGTTGGT GTCCTCTTTTGCCCAATCTGGA	Este estudio-FN377602.2
SU	pKKS825	390 pb	58°C	GAACGCTTCTCAGCCGACT ACCACTCAGGAACTTCTCTTCTGC	Este estudio- FN377602.2
SU	pDLK3	450 pb		ATCAGCACCTGAAGGGTGGA AACGGAACCAATCATCAAATCGA	Este estudio-GU562626.1
SU	pAVX	259 pb		CCACGCACCTGTAGATGAACGTGT ACGTTTTGCCATCGATTGGAACGC	Este estudio-CP001784.1
SU	pWBG764	253 pb		GTATCTGATTTCGTATTATTGG ATCTTTCAGCTACTACGTTC	Este estudio-GQ900468.1
SU	SAP015B	363 pb		TTCCTGTGACATCACGCCACAT GTGCATGGCGAAAGCGGAGA	Este estudio-GQ900502.1
SU	SAP099B	722 pb		TTGCATGGCTTCGACACTTTC CTGACGCAAAGGTTATGTATGCTCT	Este estudio-GQ900449.1
SU	pETB	924 pb		GTCATTGGACGCCTAATCC GACGAACGTAAGGATGATTTAG	Este estudio- NC_003265.1

^aLas nuevas familias *rep* y las nuevas secuencias únicas aparecen marcadas en negrita.

^bDebido a la falta de controles positivos sólo se indican las temperaturas de hibridación de cebadores óptimas para aquellas PCRs en las cuales se obtuvieron cepas positivas.

Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94°C, 3 min); 30 ciclos (94°C, 1 min; T°C, 1 min y 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 10 min). Cambiando la temperatura de hibridación de cebadores (T°C) según la familia *rep*.

11. DETERMINACIÓN DE LOS GENES Y/O MECANISMOS DE RESISTENCIA

Se determinaron los mecanismos de resistencia a aquellos antibióticos para los cuales se obtuvieron cepas resistentes.

Resistencia a tetraciclina:

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

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>tet(K)</i> F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	94°C 1 min 1 ciclo	Aarestrup et al., 2000 (697 pb)
	94°C 1 min	
	55°C 2 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	
<i>tet(M)</i> F: GTTAAATAGTGTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	94°C 1 min 1 ciclo	Aarestrup et al., 2000 (576 pb)
	94°C 1 min	
	55°C 2 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	
<i>tet(L)</i> F: CATTGGTCTTATTGGATCG R: ATTACACTCCGATTTCCG	94°C 1 min 1 ciclo	Aarestrup et al., 2000 (456 pb)
	94°C 1 min	
	50°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	
<i>tet(O)</i> F: GATGGCATAACAGGCACAGAC R: CAATATCACCAGAGCAGGCT	94°C 1 min 1 ciclo	Aarestrup et al., 2000 (615 pb)
	94°C 1 min	
	50°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	

Resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas:

Tabla 28.- Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>erm(A)</i>	93°C 3 min 1 ciclo	Sutcliffe et al., 1996
F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA		(645 pb)
R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG	93°C 1 min	
	52°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>erm(B)</i>	93°C 3 min 1 ciclo	Sutcliffe et al., 1996
F: GAAAAGTACTCAACCAAATA		(639 pb)
R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA	93°C 1 min	
	52°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>erm(C)</i>	93°C 3 min 1 ciclo	Sutcliffe et al., 1996
F: TCAAAACATAATATAGATAAA		(642 pb)
R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	93°C 1 min	
	52°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>erm(F)</i>	94°C 3min 1 ciclo	Chung et al., 1999
F: CGGGTCAGCACTTTACTATTG	94°C 30 seg	(466 pb)
R: GGACCTACCTCATAGACAAG	50°C 30 seg 35 ciclos	
	72°C 2min	
	72°C 7min 1 ciclo	

Tabla 28.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones			Referencia (tamaño del amplicón)
<i>erm(T)</i>	94°C	3 min	1 ciclo	Gómez-Sanz et al., 2010
F: CCGCCATTGAAATAGATCCT				(200 pb)
R: TTCTGTAGCTGTGCTTTCAAAAA	94°C	1 min		
	55°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>erm(Y)</i>	94°C	3 min	1 ciclo	Gómez-Sanz et al., 2010
F: AGGCCCTTTTAAAGACGAAGGCA				(200 pb)
R: GCGCGATTGTTTCATTTTAAGGCC	94°C	1 min		
	55°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>msr(A)/msr(B)</i>	95°C	3 min	1 ciclo	Wondrack et al., 1996
F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAACT				(399 pb)
R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT	93°C	30 seg		
	55°C	2 min	35 ciclos	
	72°C	1,5 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>mph(C)</i>	94°C	3 min	1 ciclo	Schnellmann et al., 2006
F: ATGACTCGACATAATGAAAT				(900 pb)
R: CTACTCTTTCATACCTAACTC	94°C	1 min		
	45°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>lnu(A/A')</i>	94°C	2min	1 ciclo	Lina et al., 1999
F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG				(322 pb)
R:GCTTCTTTTCAAATACATGGTATTTTTTCGATC	94°C	30seg		
	57°C	30seg	30ciclos	
	72°C	1min		
	72°C	10min	1 ciclo	

Tabla 28.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>lnu(B)</i> F: CCTACCTATTGTTTGTGGAA R: ATAACGTTACTCTCCTATTC	94°C 5min. 1 ciclo 94°C 45seg 54°C 45seg 35 ciclos 72°C 1min 72°C 5min 1 ciclo	Bozdogan et al., 1999 (944 pb)
<i>lnu(C)</i> F: ACTGTCGCAGAGCAGGAAAGCC R: AGCATCTACACCCCAGCCACCA	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 58°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Este estudio-AY928180.1 (1111 pb)
<i>lnu(D)</i> F: ACGGAGGGATCACATGGTAAATAAAGC R: CCTGTCTTTATCGTCCTTCCAAACCGT	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 58°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Este estudio-EF452177.1 (461 pb)
<i>vga(A)</i>- variante de <i>vga(A)</i> F: AGTGGTGGTGAAGTAACACG R: GGTTCATACTCAATCGACTGAG	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 56°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Este estudio-FN806791.1 (1264 pb)
<i>vga(B)</i> F: TGACAATATGAGTGGTGGTG R: GCGACCATGAAATTGCTCTC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 54°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Hammerum et al., 1998 (576 pb)

Tabla 28.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>vga(C)</i> F: ACGAGGGGACAATCACGCCG R: TTGGTCGTCGGTTCGTCTGC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 58°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz et al., 2010 (156 pb)
<i>vga(E)</i> F: GAAATATGGGAAATAGAAGATGG R: TGATTCTCTAACCACTCTTC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 52°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Schwendener et al., 2011 (994 pb)
<i>lsa(B)</i> F: TGCCGAAGCCATGTACCGTCC R: CGGTTAGACCAACCAGCCGAACG	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 56°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz et al., 2010 (396 pb)
<i>cfr¹</i> F: TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 56°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Kehrenberg et al., 2006 (746 pb)

¹El gen *cfr* proporciona resistencia a oxazolidinonas, fenicoles, lincosamidas pleuromutilinas y estreptograminas.

Resistencia a aminoglucósidos:

Tabla 29.- Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos.

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

Resistencia a trimetoprim:

Tabla 30.- Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a trimetoprim.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>dfrS1</i> F: CCTTGGCACTTACCAAATG R: CTGAAGATTCGACTTCCC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 50°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (374 pb)
<i>dfrD</i> F: TTCTTTAATTGTTGCGATGG R: TTAACGAATTCTCTCATATATATG	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 50°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (582 pb)
<i>dfrG</i> F: TCGGAAGAGCCTTACCTGACAGAA R: CCCTTTTTGGGCAAATACCTCATTC	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 58°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz et al., 2010 (323 pb)
<i>dfrK</i> F: GAGAATCCCAGAGGATTGGG R: CAAGAAGCTTTTCGCTCATAAA	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 1 min 56°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Gómez-Sanz et al., 2010 (423 pb)

Resistencia a fenicoles:

Tabla 31.- Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de genes de resistencia a fenicoles.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones			Referencia (tamaño del amplicón)
<i>fexA</i>	94°C	1min	1 ciclo	Kehrenberg et al., 2005 (1272 pb)
F: GTACTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA				
R: CGCATCTGAGTAGGACATAGCGTC	94°C	1min		
	48°C	2min	34 ciclos	
	72°C	3min		
	72°C	7min	1 ciclo	
<i>cat_{pC221}</i>	94°C	3 min	1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (434 pb)
F: ATTTATGCAATTATGGAAGTTG				
R: TGAAGCATGGTAACCATCAC	94°C	1 min		
	50°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>cat_{pC194}</i>	94°C	3 min	1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (570 pb)
F: CGACTTTTAGTATAACCACAGA				
R: GCCAGTCATTAGGCCTAT	94°C	1 min		
	50°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
<i>cat_{pC223}</i>	94°C	3 min	1 ciclo	Schnellmann et al., 2006 (283 pb)
F: GAATCAAATGCTAGTTTTAACTC				
R: ACATGGTAACCATCACATAC	94°C	1 min		
	50°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	

Resistencia a quinolonas:

Para estudiar 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) y para *S. epidermidis* (*grlA* y *gyrA*-GenBank NC_002976.3).

Tabla 32.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *grlA* y *gyrA*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>grlA</i> (<i>S. aureus</i>) F: ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA	94°C 10 min 1 ciclo 94°C 20 seg 55°C 20 seg 25 ciclos 72°C 50 seg 72°C 5 min 1 ciclo	Schmitz et al., 1998 (559 pb)
<i>gyrA</i> (<i>S. aureus</i>) F: AATGAACAAGGTATGACACC R: TACGCGCTTCAGTATAACGC	94°C 10 min 1 ciclo 94°C 20 seg 55°C 20 seg 25 ciclos 72°C 50 seg 72°C 5 min 1 ciclo	Schmitz et al., 1998 (222 pb)
<i>grlA</i> (<i>S. epidermidis</i>) F: TCGCAATGTATTCAAGTGGG R: ATCGTTATCGATACTACCATT	94°C 3 min 1 ciclo 94°C 30 seg 55°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	Yamada et al., 2008 (197 pb)

Tabla 32.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *grlA* y *gyrA*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>gyrA</i> (<i>S. epidermidis</i>)	94°C 3 min 1 ciclo	Yamada et al., 2008
F: ATGCGTGAATCATTCTTAGACTATGC		(284 pb)
R: GAGCCAAAGTTACCTTGACC	94°C 30 seg	
	55°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 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 (GenBank X68425.1) y L3, L4 y L22 (GenBank GQ995195.1).

Tabla 33.- 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 (tamaño del amplicón)
ARNr 23S	94°C 5 min 1 ciclo	Dibo et al., 2004
F: GCGGTCGCCTCCTAAAAG		(420 pb)
R: ATCCCGGTCTCTCGTACT	94°C 1 min	
	54°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	

Tabla 33.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>rplC</i> (L3) F: ACCCTGATTTAGTTCGGTCTA R: GTTGACGCTTTAATGGGCTTA	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 1 min 52°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	Miller et al., 2008 (799 pb)
<i>rplD</i> (L4) F: TCGCTTACCTCCTTAATG R: GGTGGAAACACTGTAAGT	94°C 5 min 1 ciclo 92°C 1 min 54°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	Miller et al., 2008 (1080 pb)
<i>rplV</i> (L22) F: CAACACGAAGTCCGATTGGA R: GCAGACGACAAGAAAACAAG	94°C 5 min 1 ciclo 94°C 1 min 52°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo	Mendes et al., 2010 (468 pb)

Resistencia a mupirocina:

En las cepas de *S. aureus* se estudió por PCR la presencia del gen *mupA* (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). Las secuencias de *ileS* se compararon con la secuencia base GenBank FR821779.1.

Tabla 34.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *mupA* e *ileS*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>mupA</i>	94°C 5min 1 ciclo	Udo et al., 2003
F: CCCATGGCTTACCAGTTGA	94°C 3min	(419 pb)
R: CCATGGAGCACTATCCGAA	60°C 45seg 32ciclos	
	72°C 1min	
	72°C 2min. 1 ciclo	
<i>ileS</i> ¹	94°C 5 min 1 ciclo	Hurdle et al., 2004
F:AGCCTAGTAAAAGCATGTATGTTATATCAC	94°C 1 min	(3217 pb)
R:GCGTTACTGTTATGATACATTCAATTAECT	50°C 2 min 30 ciclos	
	72°C 3 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	

¹Para 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 35.- Secuencia de los cebadores y condiciones empleados para la amplificación de los genes *fusA*, *fusB* y *fusC*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>fusA</i> ¹	94°C 5 min 1 ciclo	O'Neill et al., 2002
F: CGCGGATCCTATCGTATTTATTCAGTAAT	94°C 1 min	(2100 pb)
R: AAGGATCCCTTGTATTTAACCTAGGCTA	56°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	

Tabla 35.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>fusB</i>	94°C 3 min 1 ciclo	McLaws et al., 2008
F: CTATAATGATATTAATGAGATTTTTGG		(431 pb)
R: TTTTACATATTGACCATCCGAATTGG	94°C 30 seg	
	57°C 30 seg 25 ciclos	
	72°C 45 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>fusC</i>	94°C 3 min 1 ciclo	McLaws et al., 2008
F: TTAAAGAAAAAGATATTGATATCTCGG		(332 pb)
R: TTTACAGAATCCTTTTACTTTATTTGG	94°C 30 seg	
	57°C 30 seg 25 ciclos	
	72°C 45 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	

¹Para secuenciar el gen *fusA* se utilizaron los siguientes cebadores *fusA1* (GCGTCAGGCTACAACCTTATGG), *fusA2* (CAATAGTTACTTTTCATCATTTGG) y *fusA3* (TTATTGGTCACCGTGCTAGCAACC).

12. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA

Se determinó la presencia de los genes *lukF*-PV y *lukS*-PV que codifican la leucocidina de Panton-Valentine (LPV), de los genes codificantes de las hemolisinas alfa-, beta-, delta-, gamma- y gamma-variante (*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg* y *hlg_v*), de los genes codificantes de las toxinas exfoliativas A, B y D (*eta*, *etb*, *etd*) y del gen codificante de la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST) (*tst*). Todo ello, se llevó a cabo por PCRs simples.

Tabla 36.- Secuencia de los cebadores empleados en las PCRs simples para la amplificación de genes codificantes de factores de virulencia.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>lukF-PV/lukS-PV</i> F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC	Lina et al., 1999 (443 pb)
<i>hla</i> F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	Jarraud et al, 2002 (209 pb)
<i>hlb</i> F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	Jarraud et al., 2002 (309 pb)
<i>hld</i> F: AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG R: TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA	Jarraud et al., 2002 (111pb)
<i>hlg</i> F: GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA R: CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG	Jarraud et al., 2002 (535 pb)
<i>hlg_v</i> F: GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT R: ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG	Jarraud et al., 2002 (390 pb)
<i>eta</i> F: ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT R: TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	Jarraud et al., 2002 (190 pb)
<i>etb</i> F: CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC R: AGTGA ACTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	Jarraud et al., 2002 (612 pb)
<i>etd</i> F: AACTATCATGTATCAAGG R: CAGAATTTCCCGACTCAG	Yamaguchi et al., 2002 (376 pb)
<i>tst</i> F: TTCACTATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT R: TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT	Jarraud et al., 2002 (180 pb)

Las condiciones de amplificación fueron las mismas para cada uno de los genes: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 30 seg; 55°C, 30 seg y 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 10 min).

Por otro lado, se analizó también la presencia 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*.

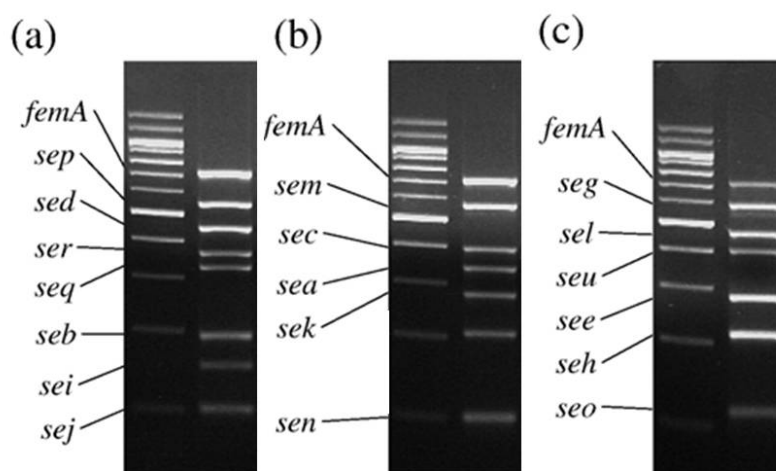


Figura 19. Gel con los tamaños de los amplicones de las 18 enterotoxinas: a) primera PCR múltiple; b) segunda PCR múltiple; c) tercera PCR múltiple (tomada de Hwang et al., 2007).

Tabla 37.- 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
<i>sea</i> F: ATGGTTATCAATGTGCGGGTGIIIIICCAAACAAAAC R: TGAATACTGTCCTTGAGCACCAIIIIATCGTAATTAAC	344 pb
<i>seb</i> F: TGGTATGACATGATGCCTGCACIIIIIGATAAATTTGAC R: AGGTACTCTATAAGTGCCTGCCTIIIIIACTAACTCTT	196 pb
<i>sec</i> F: GATGAAGTAGTTGATGTGTATGGATCIIIIIACTATGTAAAC R: AGATTGGTCAAACCTTATCGCCTGGIIIIIGCATCATATC	399 pb

Tabla 37.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>sed</i> F: CTGAATTAAGTAGTACCGCGCTIIIIATATGAAAC R: TCCTTTTGCAAATAGCGCCTTGIIIIIGCATCTAATTC	451 pb
<i>see</i> F: CGGGGGTGTAACATTACATGATIIIIICCGATTGACC R: CCCTTGAGCATCAAACAAATCATAAIIIIICGTGGACCCTTC	286 pb
<i>seg</i> F: ATAGACTGAATAAGTTAGAGGAGGTIIIIIGAAGAAATTATC R: TTAGTGAGCCAGTGTCTTGCIIIIIAATCTAGTTC	594 pb
<i>seh</i> F: CATTACATCATATGCGAAAGCAGIIIIITTACACG R: CTTCTGAGCTAAATCAGCAGTTGCIIIIIITACTCTC	218 pb
<i>sei</i> F: AGGCGTCACAGATAAAAACCTACCIIIIICAAATCAACTC R: ACAAGGACCATTATAATCAATGCCIIIIITATCCAGTTTC	154 pb
<i>sej</i> F: TGTATGGTGGAGTAACACTGCATGIIIIAATCAACTTTATG R: CTAGCGGAACAACAGTTCTGATGCIIIIIATCCATAAAT	102 pb
<i>sek</i> F: GTGTCTCTAATAATGCCAGCGCTIIIIICGATATAGG R: CGTTAGTAGCTGTGACTCCACCIIIITGTATTTAG	282 pb
<i>sel</i> F: ATTCACCAGAATCACACCGCTIIIIITACTCGTA R: GTGTAATAAATAATCATAACGAGIIIIAAGAACCATCATTC	469 pb
<i>sem</i> F: CGCAACCGCTGATGTCGGIIIIITGAATCTTAGG R: CAGCTTGTCTGTTCCAGTATCIIIIAAGTCATAAG	572 pb
<i>sen</i> F: TCATGCTTATACGGAGGAGTTACGIIIIITGATGGAAATC R: AACCTTCTTGTGGACACCATCIIIIATACATTAACGC	103 pb
<i>seo</i> F: GTGGAATTTAGCTCATCAGCGATTTCIIIIAATTTCTAGG R: GTACAGGCAGTATCCACTTGATGCIIIIIATGACAATGTGC	116 pb

Tabla 37.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño del amplicón
<i>sep</i> F: ATCATAACCAACCGAATCACCAGIIIIIGGGTGAAACTC R: GTCTGAATTGCAGGGAAGTGCIIIIIGCAATCTTAG	547 pb
<i>seq</i> F: GGTGGAATTACGTTGGCGAATCAIIIIITAGATAAACCC R: CTCTGCTTGACCAGTTCCGGTGIIIIIICAAATCGTATG	330 pb
<i>ser</i> F: TTCAGTAAGTGCTAAACCAGATCCIIIIICTGGAGAATTG R: CTGTGGAGTGCATTGTAACGCCIIIIATATGCAAACCTCC	368 pb
<i>seu</i> F: ATGGCTCTAAAATTGATGGTTCTAIIIIITAAAAACAG R: GCCAGACTCATAAGGCGAACTAIIIIITTCATATAAA	410 pb
<i>femA</i> F: ACAGCTAAAGAGTTTGGTGCCTIIIIIGATAGCATGC R: TTCATCAAAGTTGATATACGCTAAAGGTIIIIICACACGGTC	723 pb

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

En las cepas de *S. epidermidis* se estudió la presencia del operón *ica* el cual esta relacionado con la formación de biofilm (Ziebuhr et al., 1999).

Tabla 38.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección del operón *ica* y condiciones.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>icaA</i> F: GACCTCGAAGTCAATAGAGGT R: CCCAGTATAACGTTGGATACC	95°C 3 min 1 ciclo 95°C 30 seg 50°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1,5 min 72°C 5 min 1 ciclo	Ziebuhr et al., 1999 (814 pb)

Tabla 38.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>icaB</i>	95°C 3 min 1 ciclo	Ziebuhr et al., 1999
F: ATGGCTTAAAGCACACGACGC	95°C 1 min	(526 pb)
R: TATCGGCATCTGGTGTGACAG	56°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1,5 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>icaC</i>	95°C 3 min 1 ciclo	Ziebuhr et al., 1999
F: ATAAACTTGAATTAGTGTATT	95°C 30 seg	(989 pb)
R: ATATATAAACTCTCTTAACA	42°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1,5 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

En algunos casos también se estudió la presencia del gen *cna* involucrado en la colonización y en las primeras fases de la inyección (Witte et al., 2007).

Tabla 39.- Secuencia de los cebadores empleados para la detección del gen *cna*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>cna</i>	94°C 5min 1 ciclo	Witte et al., 2007
F: CGGTTCCCCATAAAAAGTGAAG	94°C 1min	(400 pb)
R: CCCATAGCCTTGTGGATTTG	50°C 1min 30 ciclos	
	72°C 2min	
	72°C 10min 1 ciclo	

13. HIBRIDACIÓN (SOUTHERN BLOT)

Se determinó la localización plasmídica o cromosómica de los genes *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)*, *cfr* y de los genes *rep* del estudio de clasificación de plásmidos mediante la técnica de hibridación. Para ello se utilizaron los kits comerciales de Roche:

“DIG-High prime DNA labeling and detection Starter Kit 1” y “Dig Wash and Block Buffer Set”.

Digestión enzimática y electroforesis

Se utilizaron dos enzimas, nucleasa S1 e *I-CeuI*, y se partió de los insertos de las cepas preparados de dos maneras diferentes.

Para la digestión con *I-CeuI* se utilizaron insertos preparados de la misma manera que los empleados en la técnica de PFGE. En el caso de los insertos utilizados para la digestión con S1, se partió de un cultivo puro en placas de BHI agar (Difco) que se inoculó en 3 mL de medio TSB caldo (BioRad) y se incubó a 37°C hasta que la densidad óptica medida a 510 nm estuvo entre 0,6-0,8 (durante aproximadamente 12-14 horas) (Barton et al., 1995). El resto de los pasos fue similar a la preparación de insertos para PFGE (página 74).

La enzima nucleasa S1 se utilizó para determinar la localización plasmídica. Esta enzima convierte los plásmidos superenrollados en largas moléculas lineales pudiendo determinarse su peso molecular por comparación con marcadores de peso molecular en una electroforesis en campos pulsados. La digestión enzimática se llevó a cabo con 15U de nucleasa S1 (Takara, Bio Inc., Shiga, Japan), 10 µL de tampón 10X y agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 100 µL. Se incubó 45 min a 37°C y se paralizó la reacción pasando los insertos a nuevos tubos eppendorf con 150 µL de tampón de parada (EDTA 0,5 M y sarcosil 1%) enfriado a 4°C. Se preparó un gel de agarosa (agarose D-5, Pronadisa, Conda) al 1% con TBE 0,5X y se llevó a cabo la electroforesis con condiciones distintas según el tamaño de los plásmidos:

- Para visualizar los plásmidos de mayor tamaño: 6 V/cm², dos rampas de 5-25 seg durante 6 horas y 30-45 seg durante 15 horas a 14°C.
- Para visualizar los plásmidos de pequeño tamaño: 6 V/cm², una rampa de 1-12 seg durante 12 horas a 14°C.

En el caso de plásmidos de muy pequeño tamaño (<3000 pb) lo que se realizó fue una extracción del ADN plasmídico el cual se sometió a electroforesis en corriente continua en un gel de agarosa D-1 (Pronadisa, Conda) al 1%. El campo eléctrico utilizado fue de 75 V durante 1 hora y 30 min.

La enzima *I-CeuI* se empleó para determinar la localización cromosómica de ciertos genes. Esta enzima reconoce secuencias de gran longitud, localizadas en el

cromosoma, correspondientes a regiones específicas del operón 23S. Para llevar a cabo la digestión a cada inserto se le añadió 10 U de *I-CeuI* (New England Biolabs, Ipswich, UK), 1 μL de BSA 0,1%, 10 μL del tampón “NEBuffer 4” 1X y agua destilada estéril, hasta un volumen final de 100 μL . Se incubó durante 4 horas a 37°C y se corrió en un gel de agarosa (agarose D-5, Pronadisa, Conda) al 0,8%. Las condiciones de la electroforesis fueron: rampa de 5-30 seg durante 18 horas, 6 V/cm², a 14°C.

Los geles fueron lavados con agua y se visualizaron y fotografiaron con un captador de imágenes ChemiGenius (GenSnap from SynGene) junto con una regla para facilitar la lectura de las bandas tras la hibridación.

Transferencia a la membrana

Para realizar la transferencia a la membrana de Nylon lo primero que se hizo fue mantener el gel 15 min en una solución desnaturalizante (NaCl 1,5, NaOH 0,5 M) y otros 15 minutos en una solución neutralizante (NaCl 1,5, Tris-HCl 0,5 M). Se lavó 5 min con agua y se colocó el gel sobre una estructura previamente preparada (**Figura 20**). Esta estructura consistió en una bandeja que contenía tampón SSC 20 X (3 M NaCl, 0,3 M Citrato sódico pH 7) sobre un soporte duro con papel absorbente (chromatography paper 3MM CHr Whatman) sumergido en el tampón por ambos extremos. El gel se situó sobre dicho papel, y encima se colocó la membrana de nylon (Roche), papel absorbente (2 láminas de chromatography paper 3MM CHr Whatman y varias láminas de BioRad Blot Absorbent Filter Paper) y peso para facilitar la transferencia. A las 24-36 horas se desmontó la estructura y se fijó el ADN a la membrana con luz ultravioleta durante 4 min.

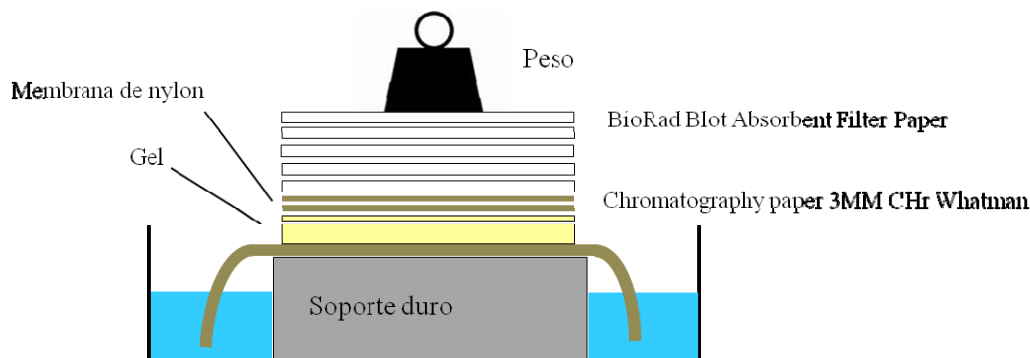


Figura 20. Dibujo esquematizado del montaje para la transferencia a la membrana.

Marcaje y síntesis de la sonda

Se llevó a cabo una PCR de un fragmento del gen correspondiente por triplicado para obtener un volumen final de 150 µL (50 µL cada tubo de PCR). Se visualizaron los amplicones obtenidos en un gel de agarosa al 1% y se purificó mediante el kit “Qiagen Gel extraction kit”. Se determinó la concentración con el Nanodrop y se utilizó el volumen necesario para tener 1 µg de ADN. Se añadió agua destilada estéril hasta completar 16 µL. Se incubó a 100°C durante 10 min y se añadió 4 µL de DIG-High Prime (vial 1, Roche). Se incubó a 37°C durante toda la noche, tras ese tiempo se puso en un baño a 64°C durante 10 min y 5 min a 100°C. Se pasó a hielo inmediatamente y se añadió 34 mL de DIG-Easy Hib (bote 7, Roche). Esta preparación se almacenó a -20°C pudiendo ser utilizada varias veces.

En el caso de las membranas obtenidas a partir de la digestión con la enzima S1 nucleasa se emplearon como sondas fragmentos de los genes cuya localización se quería conocer. Para la hibridación de las membranas obtenidas a partir de la digestión con *I-CeuI* se utilizó, además de las sondas de los genes a estudiar, una sonda del gen ARNr 16S que hibrida exclusivamente con fragmentos de ADN cromosómico.

Prehibridación e hibridación

Se introdujo la membrana en el tubo de hibridación con 34 mL de DIG-Easy Hib (bote 7, Roche) y se incubó en el horno de hibridación a 42°C durante 30 min. Transcurridos 20 min de este tiempo, se incubó la preparación de la sonda a 68°C durante 10 min. Se desechó la solución de prehibridación y se añadió la preparación de la sonda, incubando a una temperatura óptima de hibridación (T_{opt}) durante toda la noche. Para calcular la T_{opt} se determinó el contenido en GC y se utilizó la siguiente fórmula:

$$T_{opt} = [49,82 + 0,41 (\% G + C) - (600/l)] - (20^{\circ}\text{C})$$

l = longitud de la sonda en pares de bases

En el caso de las sondas preparadas para la hibridación de las familias *rep* del estudio de tipado de plásmidos la T_{opt} fue disminuida de 2°C a 5°C debido a que no todos los genes incluidos en la misma familia *rep* contenían los mismos nucleótidos que la sonda preparada.

Lavados y detección

Al día siguiente se realizaron 2 lavados de 5 min con SSC 2X + SDS 0,1% (peso/volumen) a temperatura ambiente y otros dos lavados de 15 min con SSC 0,5X + SDS 0,1% (peso/volumen) a 68°C. Para llevar a cabo la detección se equilibró la membrana con 50 mL de Washing Buffer 1X (Roche) durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó durante 30 min, también a temperatura ambiente, con 100 mL de una solución de bloqueo que contenía Blocking solution 10X (Roche) y ácido málico 10X (Roche). Se incubó otros 30 min con la solución de anticuerpo que se preparó en ese mismo momento y que contenía 5 µL de Anti-digoxigenin-AP (Roche) previamente centrifugado 5 min a 10000 r.p.m. y a 4°C y 50 mL de la solución de bloqueo. Se lavó dos veces con 100 mL de Washing Buffer 1X (Roche) durante 15 min. Se equilibró la membrana con 20 mL de Detection Buffer 1X (Roche). Se retiró esta solución y se añadió en oscuridad 10 mL de solución coloreante [200 µL de NBT/BCIP stock solution (vial 5, Roche) y 10 mL de Detection buffer 1X (Roche)] recién preparada y se incubó en un recipiente opaco. Se fotografió la membrana a las 18-20 horas junto con una regla y se analizaron los resultados obtenidos.

Stripping de la membrana

Se eliminó la sonda de la membrana para volver a hibridar con una sonda diferente. Primero se lavó con DMF (dimetilformamida), previamente calentada a 55°C, y se incubó a esa temperatura en agitación hasta la completa desaparición del color. Se lavó brevemente con agua destilada y se realizaron dos lavados con una solución de NaOH 0,2 M y SDS 0,1% (peso/volumen) durante 15 min a 37°C y en agitación. Se equilibró brevemente con SSC 2X y se dejó secar en papel absorbente.

14. TRANSFERENCIA GÉNICA

Se emplearon las técnicas de conjugación y transformación para el estudio de genes *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)* y *cfr* que confieren resistencia a lincosamidas.

14.1. Conjugación

El método utilizado fue la conjugación en filtro (Shore et al., 2010) y en todos los casos se empleó como cepa receptora *S. aureus* ATCC 29213. Para poder utilizar esta cepa, lo primero que se hizo fue obtener un mutante resistente a rifampicina de la

misma. Se sembró *S. aureus* ATCC 29213 en placas de BHI agar (Difco) con rifampicina (50 mg/L) a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, los mutantes obtenidos se conservaron a -80°C en tubos de leche (Difco) para su posterior utilización.

Se sembraron las cepas dadoras y la cepa receptora en 5 mL de BHI caldo (Difco) a 37°C durante 24 horas en agitación. En el caso de las cepas dadoras se adicionó al medio BHI caldo lincomicina (4 mg/mL) (si se trataba de los genes *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)*) o linezolid (16 mg/mL) (en el caso del gen *cfr*). Se pusieron en contacto en un tubo eppendorf estéril 100 µL de cultivo de cepa receptora con 10 µL de cultivo de cepa dadora. La mezcla se colocó en un filtro Millipore de 0,45 µm en placas de BHI agar (Difco) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se resuspendió el crecimiento producido sobre el filtro en 1 mL de BHI caldo (Difco) y se vortexó. A partir de este tubo (10^0) se prepararon diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} y se sembró 100 µL de cada una de las diluciones y del primer tubo en:

- Placas para seleccionar los posibles transconjugantes:

Placas suplementadas con el antibiótico al cual proporciona resistencia el gen que se quiere transferir (lincomicina [4 mg/mL] o linezolid [16 mg/mL]) y con rifampicina (50 mg/L).

- Placas control que seleccionan la cepa receptora:

Placas con rifampicina (50 mg/L).

- Placas control que seleccionan la cepa dadora:

Placas con lincomicina (4 mg/mL) o linezolid (16 mg/mL).

Se realizaron, además, recuentos en las placas para calcular la frecuencia de conjugación:

$$\text{Frecuencia de conjugación} = [\text{n}^\circ \text{ de transconjugantes/mL}] / [\text{n}^\circ \text{ de células receptoras/mL}]$$

14.2. Transformación

En los casos en los que no se obtuvieron transconjugantes se empleó la técnica de transformación por electroporación.

Extracción de ADN plasmídico. Se extrajo el ADN plasmídico de las cepas que se quería estudiar la capacidad de transferencia con el kit comercial “Qiagen plasmid purification midi kit” o por el método con lisostafina indicado la página 62.

Obtención de células competentes. Se utilizó como cepa receptora *S. aureus* RN4220.

- Esta cepa se sembró en 50 mL de TSB caldo (BioRad) a 37°C durante 24 horas en agitación.
- 5 mL de este cultivo, se mezcló con 250 mL de TSB caldo estéril y se incubó a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica $> 0,4$ (a 600nm).
- Se colocaron seis tubos de centrifuga estériles y una solución de sacarosa 500 mM en hielo.
- Se dividió el contenido de los 255 mL de TSB con *S. aureus* RN4220 en los seis tubos de la siguiente manera:

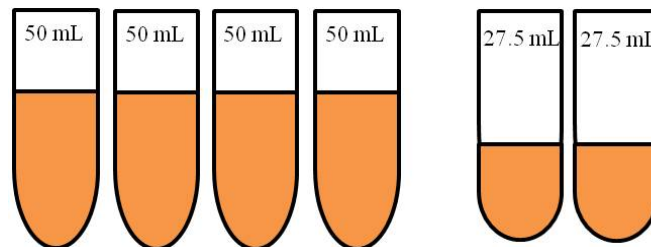


Figura 21. Distribución del TSB con *S. aureus* RN4220 para la transformación

- Se dejó 10 min en hielo, se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se separaron los tubos en dos grupos de tres tubos cada uno, y se resuspendieron los precipitados con 60 mL de la solución de sacarosa. Para ello se pasó 30 mL por los tres tubos de cada grupo quedándonos finalmente con dos tubos con 30 mL.

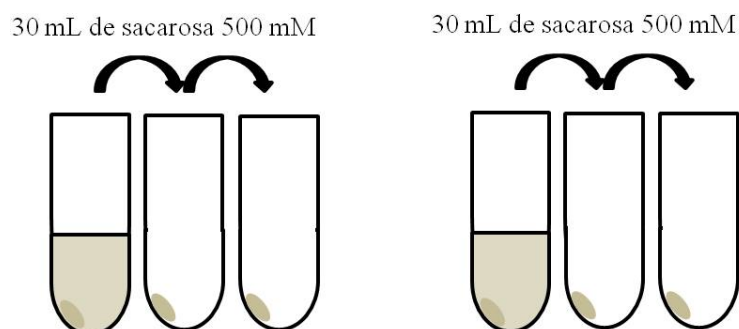


Figura 22. Resuspensión con sacarosa en la transformación

- Se centrifugaron los dos tubos a 4000 r.p.m. durante 10 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se volvió a resuspender pasando 30 mL de la solución de sacarosa por los dos tubos hasta quedarnos con uno.
- Se centrifugó ese tubo a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y se tiró el sobrenadante.
- Se resuspendió el pellet en 2 mL de la solución de sacarosa y se pasó a tubos eppendorf estériles poniendo en cada uno de ellos 40 μ L.
- Estos tubos se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C para usos posteriores.

Electrotransformación. Se tomaron los tubos eppendorf con los 40 μ L de células competentes (un tubo por cada cepa que se quería estudiar) y se añadió 1 μ L de ADN plasmídico (a una concentración de 600 $\mu\text{g/mL}$). Se dejó 30 min a temperatura ambiente y se pasaron los 41 μ L a una cubeta de electroporación de 0,1 cm (BioRad). Se sometió a un pulso eléctrico en el aparato Gene Pulser II (BioRad) con las siguientes condiciones: 2,5 KV (voltaje), 25 μ F (capacidad) y 100 Ω (resistencia). Se incubaron los 41 μ L en 1 mL de BHI caldo (Difco) a 37°C durante 2 horas en agitación y se sembraron en placas con antibiótico [clindamicina (2 mg/L) y lincomicina (8 mg/L)].

Para comprobar los posibles transconjugantes o transformantes, se utilizó la técnica del tipado de *spa* para corroborar que se trataba de la cepa receptora, y la técnica de PCR para estudiar la presencia de los genes que se querían transferir. Posteriormente, se analizaron por la técnica de dilución en agar, los cambios en la sensibilidad a antibióticos en las cepas transconjugantes y transformantes, con respecto a la cepa receptora.

15. CARACTERIZACIÓN DE ENTORNOS GENÉTICOS

Se determinaron los entornos genéticos de los genes *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)* y *cfr*. Para ello se utilizaron diferentes técnicas:

15.1. Mapeo por PCR

Se utilizó la técnica de mapeo por PCR para lo cual se diseñaron cebadores basándose en estructuras previamente descritas. El diseño se realizó de manera que se amplificasen fragmentos de ADN solapados que al secuenciarse se pudiese obtener la estructura completa. En algunos casos, y debido a que el resultado de las PCRs era

negativo, se probó con diferentes combinaciones de los cebadores. Los cebadores empleados se recogen en las **Tablas 40-42**.

Tabla 40.- Secuencia de los cebadores de PCR para el estudio de los entornos genéticos del gen *lnu(B)*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia ¹
pEF418-1-F: AGAACCTTCCTCCAGGCGTT	Este estudio-AF408195.1
pEF418-1-R: ACGGAGCTACGTCAAACAACCAG	Este estudio-AF408195.1
pEF418-2-F: TGGCGAGTGGCTAAGAGAGCAGT	Este estudio-AF408195.1
pEF418-2-R: TGCCTTTTTCTTCACGCTCTGCA	Este estudio-AF408195.1
pEF418-3-F: GCCACAGCCGCCAGAGAACA	Este estudio-AF408195.1
pEF418-3-R: TCGCCATTCAGCTGCCAGATC	Este estudio-AF408195.1
pEF418-4-F: CAACTGGTTGTTTGACGTAGCTCCG	Este estudio-AF408195.1
spc-like-inv-R: CTCCCGCACCAGCCAGTCC	Este estudio-AF408195.1
IS257-R: GTAGCCGTTAGCTACTATCTAAG	Este estudio-BX571856.1
C2944-tnp-F: CCGTAGATCTGAAGAGATC	Este estudio-AJ536194.1

¹Todos los cebadores fueron diseñados en este estudio.

Se utilizaron también los cebadores para la detección del gen *lnu(B)* descritos en la **Tabla 28**.

Tabla 41.- Secuencia de los cebadores de PCR para el estudio de los entornos genéticos del gen *vga(A)* y del gen *vga(A)*-variante

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
pCPS32-a-f: CGGTGCTACCAATCTCGCCC	Este estudio-FN806791.1
pCPS32-a-r: CTCGCTCTCCACCACTTAAGACAC	Este estudio-FN806791.1
pCPS32-b-f: TGTAATCCGTCGTGGTCTCGTCCA	Este estudio-FN806791.1
pCPS32-b-r: AACCCGACCGCAAAGAGCCG	Este estudio-FN806791.1
pCPS32-c-f: GTGGTGGAGAGCGAGTTAAAGTAGC	Este estudio-FN806791.1
pCPS32-c-r: GCGCACAGAGAGCTTGTGGG	Este estudio-FN806791.1
Tn5406-H-1: GTTCGATTGTACATCCACG	Haroche et al., 2002

Tabla 41.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
Tn5406-4-r : CTGAACCTGTGCGTGCCTAATC	Este estudio-AF186237.2
Tn5406-H-5: GATGAACAATTTGAAGTAGTTGAACC	Haroche et al., 2002
Tn5406-H-6: GATACTCATATTGAGTGGG	Haroche et al., 2002
Tn5409-3-f: GATTAGGACACGCACAGGTTTCAG	Este estudio-AF186237.2
Tn5409-2-r: CTAGTCGCTCTTGTACACGAG	Este estudio-AF186237.2
Tn54096-2-f: CAAGAAGGTGGTATGAGAATC	Este estudio-AF186237.2
att554-r-new: CGATTACACCTGCTAACGC	Este estudio-AF186237.2
<i>vga(A)</i> inv-F: CGTGTTACTTCACCACCACT	Este estudio-FN806791.1
<i>vga(A)</i> inv-R: CTCAGTCGATTGAGTATTGAACC	Este estudio-FN806791.1

Se utilizaron también los cebadores para la detección del gen *vga(A)* descritos en la **Tabla 28**.

Tabla 42.- Secuencia de los cebadores de PCR para el estudio de los entornos genéticos del gen *cfr*.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
<i>cfr</i> inv-F: TGACTCCCAACCTGCTTTATACTTCA	Este estudio-AM086211.1
<i>cfr</i> inv-R: GCTGCTTGTGGTCAATTATATGGT	Este estudio-AM086211.1
<i>fexA</i> inv-R: GACGCTATGTCTACTCAGATGCG	Este estudio-AJ715531.1
pSCFS7-1-F: GTACTGTAAGTGGACGAATATCTAC	Este estudio-FR675942.1
<i>tnpB</i> -2-F: GGAACAGTGATAAGCCGGATGAT	Este estudio-FR675942.1
<i>tnpB</i> -2-R: GAAGGTGTATCCTTCCAGTCATATC	Este estudio-FR675942.1
<i>cfr</i> -ent-1-F: CTGTCAATTCCTCAAACAG	Este estudio-FR675942.1
<i>cfr</i> -ent-1-R: ATTAATACGTCTCTGAACG	Este estudio-FR675942.1

Se utilizaron también los cebadores para la detección de los genes *cfr* y *fexA* descritos en las **Tablas 28 y 31**.

15.2. PCR inversa y secuenciación.

En el caso del gen *lnu(A)*, debido a que estaba localizado en plásmidos de pequeño tamaño (<3000 pb), la técnica utilizada para el estudio de su entorno genético fue la PCR inversa y la secuenciación del amplicón obtenido. Para ello se emplearon cebadores específicos diseñados en sentido contrario a los empleados para amplificar el gen (**Tabla 43**) y las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 35 ciclos (94°C, 1 min, 55°C 1 min, 65°C 8 min) y elongación final (72°C, 8 min).

Tabla 43.- Secuencia de los cebadores utilizados para la PCR inversa del gen *lnu(A)*.

Nombre del cebador	secuencia 5'→3'
<i>lnu(A)</i> inv-F	CCAGTTAATACATCTACCCCCAGCCACC
<i>lnu(A)</i> inv-R	GATCGAAAAATACCATGTATTTCAAAAGAAGC

En aquellos casos en los que no se pudo establecer el entorno genético del gen *vga(A)* por mapeo por PCR, se realizó también una PCR inversa con los cebadores *vga(A)*inv-F y *vga(A)*inv-R descritos en la **Tabla 41**. En este caso como los plásmidos eran de mayor tamaño (>3000 pb) se utilizó la enzima Taq-Takara DNA Polimerasa (Takara). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94°C, 1 min); 30 ciclos (98°C, 5 seg y 68°C, 15 min) y elongación final (72°C, 10 min).

Para secuenciar los fragmentos obtenidos por PCR inversa o por mapeo por PCR se emplearon los cebadores utilizados en la PCR y otros cebadores adicionales:

Tabla 44.- Secuencia de los cebadores adicionales utilizados para la secuenciación de entornos genéticos.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
<i>lnu(A)</i> -1: GACGAATGTCGGCATAGCGTGAG	Este estudio
<i>vga(A)</i> -1: GCGAGTTCTCGAACTGTT	Este estudio
<i>vga(A)</i> -2: CTCACGACTGATATATTG	Este estudio
<i>vga(A)</i> -3: GTTTAATGATTGGTTGCC	Este estudio
<i>vga(A)</i> -4: GAGATTTGTCGGGAACAC	Este estudio
<i>vga(A)</i> -5: GGAGGCTGGAGAAGAAGT	Este estudio
<i>vga(A)</i> -6: GCCATTTGTGGCTGTCGT	Este estudio

Tabla 44.- Continuación.

Cebadores (secuencia 5'→3')	Referencia
<i>vga(A)</i> -7: CTTTAGTTTAATGATTGGTTGCC	Este estudio
<i>vga(A)</i> -8: CAATTGACCTCAATACAGGTAAG	Este estudio
<i>vga(A)</i> -9: CCGTAAACCCAACCGTAA	Este estudio

15.3. Digestión y ligación

Debido a que era la primera vez que se describía el gen *lnu(B)* en *Staphylococcus* spp., se decidió completar el entorno genético obtenido por mapeo por PCR mediante la digestión del ADN, posterior ligación y amplificación por PCR inversa.

Digestión. Se eligió una enzima que cortase sólo una vez en un extremo del entorno genético que ya conocíamos gracias a mapeo por PCR. Para ello se utilizó el programa informático “NEBcutter V2.0” (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) y la enzima elegida fue *PvuII*. Se extrajo el ADN mediante el kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)” de una de las cepas *lnu(B)* positivas (C2944) y se digirió con 3 µL de extracción de ADN, 1,5 µL del buffer 10X de la enzima (NEBuffer 2), 10 U de enzima (New England Biolabs) y agua destilada hasta un volumen total de 20 µL. La mezcla se incubó a 37°C durante 4 horas.

Precipitación en alcohol. Se añadió 4 µL del tampón P3 del kit de Qiagen (3 M acetato potásico, pH 5,5) para neutralizar la digestión y 100 µL de etanol absoluto enfriado previamente a -20°C. Se mezcló por inversión varias veces y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 min. Se centrifugó a 4°C durante 30 min a 13000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 100 µL de etanol al 80% enfriado previamente a -20°C. En este caso no se mezcló, sino que se centrifugó directamente a 4°C durante 10 min a 13000 r.p.m. y se tiró el sobrenadante. Se dejó secar hasta que el etanol se evaporase completamente y se resuspendió el pellet con 23,5 µL de agua destilada estéril.

Ligación. Se incubaron los 23,5 µL durante 5 min a 45°C y 22 µL de los mismos se mezclaron con 3 µL del tampón de la ligasa (Buffer T4 ligasa 10X), 3 µL de la solución ATP (10X) y 20 U de la enzima ligasa (Bioline). Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 14°C.

PCR inversa. Utilizando el producto de ligación como sustrato, se llevó a cabo una PCR inversa utilizando los cebadores pEF418-3-F (en la **Tabla 40**) y spc-like-inv-R (CTCCCGCACCCAGCCAGTCC), ambos diseñados en este estudio a partir de la secuencia GenBank AF408195.1.

16. 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 el entorno genéticos de algunos genes, determinar los genes *rep* en el estudio de clasificación de plásmidos y tipar molecularmente las cepas mediante tipo de *spa* y MLST .

Purificación del producto de PCR

En los casos en que al visualizar el producto de PCR se detectaban varias bandas, se recortó el fragmento del tamaño esperado directamente del gel y se purificó mediante el kit “QIAquick GEL Extraction” (Qiagen). En algunos casos los productos de PCR fueron purificados antes de secuenciarse empleando el kit “GFX™ Polymerase Chain Reaction DNA Purification Kit” (Amersham Biosciences). En otros casos la purificación la llevó a cabo la empresa encargada de la secuenciación (Cogenics, United Kingdom).

Reacción de secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo por la empresa Cogenics (United Kingdom) la cual utiliza un sistema automático ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems) y por la empresa Macrogen (Japón) que utiliza el secuenciador automático 3730XL (Applied Biosystems).

Análisis de las secuencias

Para el análisis de las secuencias se emplearon diversas herramientas informáticas 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 (European Bioinformatics Institute): 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 Alignment Search Tool): 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 (Multilocus Sequence Typing): para el estudio de las secuencias tipo (STs) tanto de *S. aureus* como de *S. epidermidis*.
<http://www.mlst.net/databases/default.asp>
- ORF Finder (Open Reading Frame Finder): para localizar ORFs en las secuencias de los entornos.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>
- NEBcutter V2.0 (New englands Biolabs) y REBASE (The Restriction Enzyme DataBase): para elegir enzimas de restricción.
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>
<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>
- IS Finder (Insertion Sequence Finder): para estudiar IS en las secuencias entorno.
<http://www-is.biotoul.fr/is.html>

Para el análisis de la secuencias de la región polimórfica del gen *spa* se utilizó el programa informático “Ridom Staph-Type” versión 1.5.21 (Ridom GmbH). Para el estudio de los cromatogramas de las diferentes secuencias se empleó el programa Chromas 1.5 (Conor McCarthy). En la ampliación de un sistema de clasificación de plásmidos se utilizó el programa BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

RESULTADOS

1. CASOS CLÍNICOS CAUSADOS POR CEPAS SARM CC398 EN PACIENTES CON RELACIÓN LABORAL CON GANADO PORCINO

Las cepas clínicas y de los frotis nasales de los pacientes y sus familiares de los 7 casos clínicos CC398 detectados, fueron aisladas e identificadas en el Hospital Royo Villanova de Zaragoza (Dra. Carmen Aspiroz). Posteriormente la caracterización genética de dichas cepas SARM se realizó en La Universidad de La Rioja. Las cepas obtenidas en cada uno de los casos se indican en la **Tabla 10** en la página 49.

Con el fin de determinar el posible origen animal de las cepas SARM de los 7 casos clínicos, se decidió conocer la prevalencia de animales portadores de SARM en las explotaciones porcinas relacionadas con dichos casos y caracterizar las cepas aisladas. En este sentido, de los 7 casos clínicos causados por SARM CC398, se pudo estudiar la prevalencia de SARM en los animales sanos de las granjas relacionadas con 6 de ellos. Sólo en el caso número 5 (paciente sin relación con animales y cuyo padre había sido trabajador en una granja hacía ya 10 años), no fue posible obtener muestras porcinas.

La toma de muestras fue realizada bajo la supervisión de la Dra. Carmen Aspiroz y los hisopos fueron remitidos a La Universidad de La Rioja. La detección y el aislamiento de las cepas fueron realizados según se detalla en material y métodos.

La prevalencia de colonización fue muy diferente de unas explotaciones a otras (**Tabla 45**). En dos de ellas, el porcentaje de colonización fue muy elevado (>90%). Sin embargo, en otras dos (caso 3 y 4), no se obtuvo ninguna cepa SARM a pesar de que se aislaron cepas de otras especies del género *Staphylococcus* resistentes a meticilina.

Tabla 45.- Colonización por SARM detectada en los animales de las 6 explotaciones porcinas relacionadas con los casos clínicos 1-4, 6 y 7.

Caso clínico	Fecha de muestreo	Cerdos estudiados	Cerdos colonizados por SARM (%)	Cepas SARM obtenidas
1	Septiembre 2008	21	7 (33)	8
2	Enero 2009	12	11 (92)	11
3	Agosto 2009	17	0 (0)	0
4	Agosto 2009	12	0 (0)	0
6	Marzo 2010	9	9 (100)	9
7	Enero 2010	18	9 (50)	9

Se caracterizaron fenotípica y genéticamente las cepas de origen humano y animal obtenidas en cada uno de los casos clínicos. En aquellos casos en los que se obtuvieron cepas SARM de ambos orígenes se analizaron dichas cepas por PFGE. De esta forma, se pretendió estudiar si los mismos clones de SARM se encontraban tanto en los pacientes y/o familiares, como en los animales sanos de las granjas y establecer así la posible transferencia de cepas SARM del animal al hombre.

A continuación se analizarán los resultados de los casos clínicos de forma individualizada:

Caso clínico 1:

Se aislaron dos cepas SARM que contenían el gen *mecA*, de la lesión cutánea de la joven ecuatoriana las cuales presentaban diferentes características morfológicas. Una de las cepas (C1570) fue tipada como CC398-t011 y mostró resistencia además de a beta-lactámicos, a tetraciclina, macrólidos y lincosamidas. La segunda cepa (C1569) fue tipada como CC1-t127 y presentó un fenotipo de multiresistencia portando 11 genes de resistencia. Además, esta segunda cepa resultó resistente a quinolonas presentando cambios aminoacídicos en GrlA (Ser80Phe) y GyrA (Ser84Leu) (**Tabla 46**).

La paciente vivía con su familia (padre, madre y hermano) en el recinto de una granja de cerdos, donde trabajaban tanto el padre como la madre. Todos los miembros de la familia resultaron estar colonizados por SARM y se aislaron 6 cepas que fueron caracterizadas (**Tabla 46**). Las variantes genéticas detectadas en las cepas nasales fueron: CC398-t108 (paciente, padre y madre), CC1-t127 (madre), CC398-t011 (hermano). En la muestra nasal de la paciente no se detectaron cepas pertenecientes al mismo complejo clonal y con el mismo tipo de *spa*, que las halladas en la lesión (CC1-t127 y CC398-t011). Sin embargo, en las muestras nasales de la madre y del hermano sí se detectaron cepas con similares características a las de la lesión de la paciente (cepas C1578 y C1574, respectivamente).

Por otro lado, todos los miembros de la familia resultaron estar colonizados por cepas SARM CC398. Todas las cepas SARM CC398 obtenidas a partir de las muestras nasales fueron resistentes a tetraciclina, macrólidos y lincosamidas. Además, tres de ellas presentaron sensibilidad disminuida a quinolonas aunque no se detectaron cambios aminoacídicos en GrlA ni GyrA. Destacar que las cepas SARM CC1-t127

(C1569 y C1578), y una de las cepas SARM CC398-t011 (C1576), presentaron un fenotipo de multirresistencia, siendo resistentes a 5 o más familias de antibióticos. Por otro lado, se analizó por PFGE la relación clonal de las 8 cepas de origen humano y cada tipo de *spa* fue adscrito a un patrón de PFGE: A (t108), B (t011) y C (t127) (**Tabla 46**).

Por otro lado, a partir de los 21 cerdos sanos estudiados de la granja relacionada con este caso clínico (situada en la proximidad de la casa de los granjeros) se aislaron 8 cepas SARM a partir de 7 animales. Estas cepas fueron también CC398 (*spa* t011, t1255 y t1197) y CC188 (*spa* t012). Todas las cepas fueron resistentes a tetraciclina, macrólidos y lincosamidas, y cinco de ellas también a aminoglucósidos y/o trimetoprim-sulfametoxazol. Algunas cepas presentaron también sensibilidad disminuida a quinolonas (**Tabla 47**).

Si comparamos las características de las cepas de origen humano (paciente y familiares) con las de las cepas de origen animal (**Tablas 46 y 47**), vemos como en ambos casos se detectaron cepas SARM CC398. Sin embargo, sólo un tipo de *spa* (t011) fue detectado en ambos orígenes. La cepa porcina C1650 presentó las mismas características fenotípicas y genotípicas que la cepa multirresistente aislada a partir de la muestra nasal del hermano (C1676) excepto por la presencia del gen *tet(M)*.

Las cepas de animales se analizaron también por PFGE con el fin de establecer si presentaban o no el mismo patrón que las de origen humano. Se observó que el patrón B aparecía en cepas de ambos orígenes (**Figura 26**: en el apartado de dinámica de la colonización). Estos resultados sugieren la transferencia de cepas SARM CC398 del animal al hombre. Sin embargo, otro dato destacable es que no se obtuvieron cepas SARM CC1 en las muestras de los cerdos a pesar de que una cepa de este linaje clonal se obtuvo de la lesión de la paciente (C1569). En cuanto a la cepa C1651 perteneció al linaje CC188 (ST793)-t012 el cual no fue detectado en las muestras de origen humano.

Las 16 cepas de origen humano y animal estudiadas fueron negativas por PCR para los genes de virulencia: *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*.

Tabla 46.- Características de las 8 cepas de origen humano aisladas a partir de la lesión de la paciente del caso clínico 1 y de las muestras nasales de ella y de su familia.

Cepa	Origen	CC	ST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec</i>	<i>agr</i>	Patrón PFGE	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:	
									GrlA	GyrA
CEPAS CLÍNICAS										
C1570	Barbilla	CC398	ST398/t011	V	I	B	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA, tet(K), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B)</i>	NR ^b	NR
C1569	Barbilla	CC398	ST1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(L), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrK</i>	S80F	S84L
CEPAS NASALES										
C1571	Paciente	CC398	ST398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B)</i>	Salvaje ^c	Salvaje
C1577	Madre	CC398	ST398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B)</i>	Salvaje	Salvaje
C1578	Madre	CC398	ST1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(L), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrK</i>	S80F	S84L
C1574	Hermano	CC398	ST398/t011	V	I	B	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA, tet(K), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B)</i>	NR	NR
C1576	Hermano	CC398	ST398/t011	V	I	B	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>mecA, tet(K), tet(L), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrK</i>	NR	NR
C1572	Padre	CC398	ST398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B)</i>	Salvaje	Salvaje

^aTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia.

^bNR: No Realizado (se trata de cepas sensibles a quinolonas).

^cSalvaje: no se han detectado mutaciones.

Tabla 47.- Características de las 8 cepas SARM aisladas a partir de las muestras nasales de los cerdos de la granja relacionada con el caso clínico 1.

Cepa	Animal	CC	ST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec</i>	<i>agr</i>	Patrón PFGE	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:	
									GrIA	GyrA
C1650	1	CC398	ST398/t011	V	I	B	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>lnu</i> (A), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>dfrK</i>	NR ^b	NR
C1641	2	CC398	ST398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C)	NR	NR
C1652	3	CC398	ST398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrK</i>	NR	NR
C1640	4	CC398	ST398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B)	NR	NR
C1655	5	CC398	ST398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B)	NR	NR
C1892	6	CC398	ST398/t1197	V	I	D	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>dfrK</i>	NR	NR
C1893	7	CC398	ST398/t1197	V	I	D	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (A), <i>ermC</i> , <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>dfrK</i>	NR	NR
C1651	1	CC188	ST798/t012	III	III	E	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet</i> (K), <i>erm</i> (A), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrK</i>	Salvaje ^c	Salvaje

^aTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia.

^bNR: No Realizado (se trata de cepas sensibles a quinolonas).

^cSalvaje: no se han detectado mutaciones.

Caso clínico 2:

Del primer muestreo del paciente (Octubre 2008, periodo 1), trabajador de una granja de cerdos, se aislaron tres cepas SARM a partir de diferentes lesiones cutáneas. Tres meses después, y tras el tratamiento de las lesiones (Enero 2008, periodo 2), se aislaron cepas SARM con distintas características. Las cepas aisladas en ambos periodos se muestran en la **Tabla 48**. Se aislaron cepas SARM de los frotis nasales del paciente en los dos periodos (**Tabla 48**). Sin embargo, las muestras nasales tomadas de su mujer y su hijo, quienes no tenían contacto con la explotación porcina, resultaron negativas.

Por tanto, en el caso 2 se aislaron un total de 12 cepas SARM: 6 cepas procedentes de las muestras tomadas de las lesiones y otras 6 cepas obtenidas a partir de las muestras nasales del paciente. Todas las cepas de las lesiones y tres de las cepas nasales fueron SARM CC398-t011. Estas cepas fueron resistentes a tetraciclina, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol y presentaron múltiples genes de resistencia (**Tabla 48**). Tres de ellas presentaron, además, sensibilidad disminuida a quinolonas. Se estudió la posible presencia de mutaciones en *GrlA* y *GyrA* en una de ellas (C1676), pero no se detectaron cambios aminoacídicos.

Las restantes tres cepas nasales fueron tipadas como CC398-t108 (2 cepas) y CC398-t588 (1 cepa). Los fenotipos de resistencia fueron distintos en cada una de ellas siendo todas resistentes, además de a beta-lactámicos, a tetraciclina, lincomicina y trimetoprim-sulfametoxazol.

Todas las cepas SARM obtenidas a partir del paciente mostraron altos niveles de resistencia a lincomicina (CMI >128 mg/L) y contenían el gen *lnu(A)*. Once de estas cepas fueron también resistentes a eritromicina y clindamicina y portaban los genes de resistencia *erm(A)* y *erm(C)*. La cepa restante (C1859) que resultó negativa para genes *erm* y positiva para *lnu(A)*, presentó un fenotipo de resistencia poco habitual consistente en sensibilidad a eritromicina y resistencia a lincomicina. El gen *lnu(A)* codifica una lincomicina nucleotidil transferasa y confiere sólo resistencia a algunas lincosamidas, como lincomicina o pirlimicina, pero no a clindamicina. Esto se ve confirmado con que la CMI de este antibiótico en la cepa C1859 fue 0,5 mg/L.

Tras el análisis por PFGE se obtuvieron tres patrones no relacionados (A, B y C) y dentro de ellos diferentes subtipos. De esta forma, todas las cepas SARM CC398-

t011 se englobaron dentro del patrón A (con dos subtipos A1 y A2). Las cepas SARM CC398-t108 dentro del B (con los subtipos B1 y B2). Y la única cepa con *spa* tipo t588 se correspondió con el patrón C.

En los animales sanos de la granja relacionada con este caso clínico se aislaron 11 cepas SARM (procedentes de 11 animales de los 12 testados), todas ellas pertenecientes al CC398 (**Tabla 49**). En estas cepas se hallaron dos tipos de *spa* (t011 y t108), ambos detectados también en las cepas obtenidas a partir del paciente. Las cuatro cepas con *spa* tipo t011 presentaron el tipo de SCC*mec* IVa y las 7 cepas restantes con *spa* tipo t108 poseían el SCC*mec* tipo V. Nueve de las cepas mostraron altos niveles de resistencia a lincomicina (CMI>128 mg/L) mediada por el gen *lnu(A)*. Las dos cepas SARM CC398-t011 fueron también resistentes a eritromicina y clindamicina debido a la presencia de genes *erm*. Sin embargo, todas las cepas SARM CC398-t108, aisladas a partir de las muestras de los animales, presentaron el fenotipo poco frecuente de sensibilidad a eritromicina y resistencia a lincomicina.

Se analizaron por PFGE las cepas obtenidas a partir del paciente y a partir de los animales con el fin de saber si se trataba de los mismos clones y se observó que cada tipo de *spa* correspondió con un patrón de PFGE con diferentes subtipos: t011 (A1-A5), t108 (B1 y B2) y t588 (C). Si comparamos las cepas de origen humano con las de origen animal vemos como cepas *spa*-t011-A1-PFGE y *spa*-t108-B2-PFGE fueron aisladas de muestras de ambos orígenes (**Figura 23**). Esto sugiere la transmisión de cepas SARM CC398 del animal al hombre. Es interesante destacar también que todas las cepas con el fenotipo de sensibilidad a eritromicina y resistencia a lincomicina, correspondieron con el patrón de PFGE B2.

Ninguna de las cepas estudiadas, tanto de origen humano como animal, presentó los genes codificantes de las toxinas: Leucocidina de Pantón-Valentine, Toxina del Síndrome del Shock Tóxico, o toxinas exfoliativas A, B, C y D.

Tabla 48.- Características de las 12 cepas de origen humano aisladas a partir de las lesiones del paciente del caso clínico 2 y de sus muestras nasales.

Cepa	Origen	Periodo ^a	CC	ST/spa	SCCmec	agr	Patrón PFGE	CMI (mg/L)		Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^b	Genotipo de resistencia
								CLI	LIN		
CEPAS CLÍNICAS											
C1676	Barbilla	1	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1677	Dorso de la nariz	1	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1675	Cuero cabelludo	1	CC398	ST398/t011	IVa	I	A2	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1870	Canal auditivo	2	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1871	Barbilla	2	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1872	Mano	2	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
CEPAS NASALES											
C1673	Paciente	1	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1674	Paciente	1	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1856	Paciente	2	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>
C1858	Paciente	2	CC398	ST398/t588	V	I	C	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT	<i>tet(K), tet(L), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), dfrS1, dfrK</i>
C1857	Paciente	2	CC398	ST398/t108	V	I	B1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT	<i>tet(L), erm(A), erm(C), lnu(A), dfrK</i>
C1859	Paciente	2	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT	<i>tet(L), lnu(A), dfrK</i>

^aPeriodo: 1) Octubre 2008 y 2) Enero 2009. ^bTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia.

Tabla 49.- Características de las 11 cepas SARM aisladas a partir de las muestras nasales de los cerdos de la granja relacionada con el caso clínico 2.

Cepa	Animal	CC	ST/spa	SCCmec	agr	Patrón PFGE	CMI (mg/L)		Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia
							CLI	LIN		
C1840	1	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrS1</i> , <i>dfrK</i>
C1841	2	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrK</i>
C1843	3	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrK</i>
C1845	4	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrK</i>
C1846	5	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrS1</i> , <i>dfrK</i>
C1847	6	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrK</i>
C1848	7	CC398	ST398/t108	V	I	B2	0,5	>128	TET, LIN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>dfrK</i>
C1842	8	CC398	ST398/t011	IVa	I	A1	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrS1</i> , <i>dfrK</i>
C1844	9	CC398	ST398/t011	IVa	I	A3	>128	>128	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrS1</i> , <i>dfrK</i>
C1849	10	CC398	ST398/t011	IVa	I	A4	0,125	1	TET, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrS1</i> , <i>dfrG</i> , <i>dfrK</i>
C1850	11	CC398	ST398/t011	IVa	I	A5	0,125	1	TET, GEN, TOB, KAN	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i>

^aTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol ; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia.

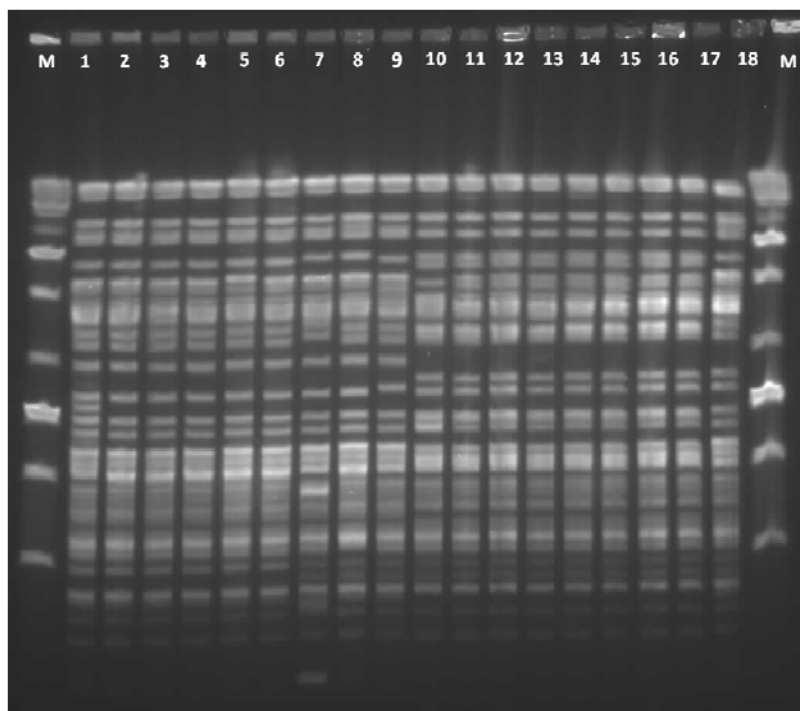


Figura 23. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del paciente y de algunos de los animales del caso clínico 2. Línea 1, t011 (A2); líneas 2–6, t011 (A1); línea 7, t011 (A3); línea 8, t011 (A4); línea 9, t011 (A5); línea 10, t108 (B1); líneas 11–17, t108 (B2); línea 18, t588 (C). M: marcador de peso molecular Middle Range.

Caso clínico 3:

Se aislaron dos cepas (C1992 y C2342) a partir de la lesión cutánea de la paciente del caso clínico número 3. Una de ellas fue sensible a meticilina (SASM), y la otra resistente (SARM). La paciente (trabajadora de una granja de cerdos) resultó, además, ser portadora nasal de SARM. No se detectaron cepas SARM en las muestras nasales tomadas a sus familiares (padre, madre y hermano) aunque sí que se detectaron cepas SASM (**Tabla 50**).

Por tanto, en este caso clínico se aislaron dos cepas SARM CC398-t011 a partir de la lesión cutánea de la paciente y de su muestra nasal. Fueron resistentes, aparte de a beta-lactámicos, a tetraciclina, macrólidos, lincosamidas y aminoglucósidos, y no presentaron los genes de virulencia *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*.

El resto de cepas (la otra cepa de la lesión y las cepas obtenidas de las muestras nasales de los familiares) fueron SASM pertenecientes a la secuencia tipo ST30. Estas

cepas fueron sensibles a todos los antibióticos estudiados y presentaron el gen de virulencia *tst*.

Tabla 50.- Características de las 7 cepas de origen humano aisladas a partir de la lesión de la paciente del caso clínico 3 y de las muestras nasales de ella y de su familia^a.

Cepa	Origen	CC/ST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec/ agr</i>	<i>tst</i>	Fenotipo de resistencia	Genotipo de resistencia
CEPAS CLÍNICAS						
C1992	Cuello	CC398/ST398/t011	IVa/I	-	OXA, FOX, TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>
C2342	Cuello	CC30/ST30/t037	-/III	+	- ^c	-
CEPAS NASALES						
C1993	Paciente	CC398/ST398/t011	IVa/I	-	OXA, FOX, TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>
C2347	Madre	CC30/ST30/t037	-/III	+	-	-
C2344	Hermano	CC30/ST30/t037	-/III	+	-	-
C2345	Padre	CC30/ST30/t037	-/III	+	-	-
C2346	Padre	CC30/ST30/t037	-/III	+	-	-

^aEn azul aparecen marcadas las cepas SARM.

^bOXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina.

^cEstas cepas fueron sensibles a todos los antibióticos estudiados.

Como se ha explicado anteriormente, en los casos 3 y 4 no se aislaron cepas SARM de la explotación porcina relacionada con dichos casos, pero si otros estafilococos resistentes a meticilina (RM). Se caracterizaron estas cepas con el fin de establecer si los mismos genes de resistencia encontrados en las cepas de origen humano, se encontraban circulantes en las explotaciones porcinas.

Se analizaron muestras nasales de 5 cerdos y en todos ellos se detectó cepas resistentes a meticilina de las especies (**Tabla 51**): *S. simulans*, *S. lentus* y *S. sciuri*. Algunos de los genes presentes en las cepas SARM CC398 obtenidas del paciente (C1992 y C1993) fueron hallados en estas cepas de origen animal: *tet(L)*, *erm(A)*, *erm(C)* y *msr(A)/msr(B)*.

Por último, no se detectaron los genes de virulencia *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd* en ninguna de las cepas de estafilococos RM de los animales relacionados con el caso 3.

Tabla 51.- Características de las cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina aisladas a partir de los cerdos de la granja relacionada con el caso clínico 3.

Cepa	Animal	Especie	SCCmec	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia
C2371	1	<i>S. simulans</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ^I , LEV ^I	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i>
C2372	2	<i>S. simulans</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>erm(B)</i>
C2373	3	<i>S. lentus</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i>
C2374	4	<i>S. sciuri</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI, FUS ^I	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i>
C2375	5	<i>S. sciuri</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI, FUS ^I	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(B)</i>

Caso clínico 4:

En el caso clínico número 4 se aislaron cepas SARM en las muestras de las lesiones de la mano del paciente, tomadas en el primer muestreo (Junio 2009) y en las muestras cutáneas tomadas en sucesivas visitas del paciente con el fin de ver su evolución (Agosto-Septiembre 2009 y Enero-Marzo 2010) (**Tabla 52**). Además, el paciente y sus dos hermanos trabajaban en una granja de cerdos. Su padre estaba jubilado pero ayudaba esporádicamente. Tanto el paciente, como su padre, su madre y sus hermanos fueron portadores nasales de SARM (**Tabla 52**).

De esta forma, en el caso clínico número 4 se aislaron 17 cepas: 9 procedentes de las lesiones cutáneas del paciente en diferentes periodos, y 8 cepas procedían de las muestras nasales de él y de los miembros de su familia. Todas las cepas obtenidas fueron SARM CC398 excepto una de ellas (C2361) que fue obtenida a partir de una muestra nasal de la madre, y resultó ser SASM CC30. En un primer momento, y hasta la segunda revisión (Septiembre 2009), todas las cepas aisladas de las lesiones presentaron el tipo de *spa* t011. A partir de esta fecha empezaron a identificarse cepas con el tipo de *spa* t108. Es interesante reseñar que ambos tipos de *spa* fueron detectados en las muestras nasales de los convivientes. Además, aunque el tipo de *spa* t108 no fue

detectado en las lesiones hasta la segunda revisión, este *spa* ya había sido identificado en la muestra nasal del paciente durante el primer muestreo (Junio 2009) (**Tabla 52**).

Todas las cepas SARM CC398 exceptuando la cepa C2362, presentaron resistencia, además de a beta-lactámicos, a tetraciclina, macrólidos y lincosamidas. La cepa C2362, obtenida a partir de una muestra nasal de la madre, mostró resistencia a clindamicina (CMI 64 mg/L) y sensibilidad a eritromicina (CMI 4 mg/L). El gen responsable de este perfil de resistencia fue *vga(A)* el cual codifica un transportador ABC que produce resistencia cruzada a estreptograminas A, pleuromutilinas y lincosamidas.

Algunas de las cepas SARM CC398 presentaron resistencia, aparte de a los antibióticos anteriormente citados, a tobramicina (mediada por el gen *ant(4')-Ia*) y/o a quinolonas (identificándose los cambios aminoacídicos Ser84Leu en GrlA y Ser80Phe en GyrA). Se observó también resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, detectándose el gen de resistencia a trimetoprim *dfpK* en algunas de las cepas con tipo de *spa* t011.

Todas las cepas de origen humano obtenidas a partir del caso 4 fueron negativas para los genes de virulencia analizados (*lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*).

En cuanto a las cepas de estafilococos RM aisladas en la explotación porcina relacionada con el caso clínico 4, todas ellas pertenecieron a la especie *S. sciuri* y su SCC*mec* fue tipo III (**Tabla 53**). Los genes de resistencia detectados tanto en las cepas de origen humano como de origen animal fueron: *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *erm(A)*, *erm(B)* y *erm(C)*. Es destacable la presencia de una cepa (C2376) con el fenotipo eritromicina-sensible/lincomicina-resistente que portaba el gen *lnu(A)*. Se determinó la CMI de clindamicina y lincomicina de esta cepa y los valores obtenidos fueron 2 mg/L y >128 mg/L, respectivamente. Es destacable que ya se detectó este fenotipo en una cepa de las muestras nasales del caso clínico 4, pero en esa cepa (C2362) el gen responsable fue el *vga(A)*.

Por último, no se detectaron los genes de virulencia *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd* en ninguna de las cepas de estafilococos RM aisladas a partir de los animales sanos relacionados con el caso 4.

Tabla 52.- Características de las 17 cepas de origen humano aisladas a partir de las lesiones del paciente del caso clínico 4 y de las muestras nasales de él y de sus familiares.

Cepa	Origen	Periodo ^a	CC	CC/spa	SCCmec	agr	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^b	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:	
									GrlA	GyrA
CEPAS CLÍNICAS										
C2353	Uña 3 derecha	1	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, SXT, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(B), dfrK</i>	S84L	S80P
C2349	Uña 3 izquierda	1	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(B), ant(4')-Ia, dfrK</i>	S84L	S80P
C2352	Uña 4 izquierda	1	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(B)</i>	S84L	S80P
C2366	Uña 3 izquierda	2	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(A), erm(B), dfrK</i>	NR ^c	NR
C2538	Uña 3 izquierda	3	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, SXT, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), erm(B), dfrK</i>	S84L	S80P
C2539	Uña 3 derecha	3	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(C), ant(4')-Ia</i>	NR	NR
C2768	Uña 3 izquierda	4	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C), ant(4')-Ia</i>	NR	NR
C2782	Uña 3 derecha	4	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C), ant(4')-Ia</i>	S84L	S80F
C2875	Cara	5	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN	<i>mecA, tet(L), tet(M), erm(C), vga(A), ant(4')-Ia</i>	NR	NR
CEPAS NAALES										
C2350	Paciente	1	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN	<i>mecA, tet(L), erm(B), erm(C), ant(4')-Ia</i>	NR	NR
C2358	Padre	2	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(B), erm(C)</i>	NR	NR
C2361	Madre	2	CC30	ST30/t012	- ^b	III	- ^d	-	NR	NR
C2362	Madre	2	CC398	ST398/t108	V	I	TET, CLI	<i>mecA, tet(M), vga(A)</i>	NR	NR
C2363	Hermano 1	2	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, CLI	<i>mecA, tet(M), erm(C)</i>	NR	NR
C2364	Hermano 2	2	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, CLI	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>	NR	NR
C2365	Hermano 2	2	CC398	ST398/t108	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB ¹ , KAN	<i>mecA, tet(L), tet(M), erm(C), ant(4')-Ia</i>	NR	NR
C2541	Paciente	3	CC398	ST398/t011	V	I	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA, tet(K), tet(L), tet(M), erm(B), ant(4')-Ia, dfrK</i>	S84L	S80F

^aPeriodo: 1) Junio 2009 2) Agosto 2009 3) Septiembre 2009 4) Enero 2010 5) Marzo 2010. ^bTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia. ^cNR: No Realizado (se trata de cepas sensibles a quinolonas). ^dEsta cepa resultó sensible a todos los antibióticos estudiados incluido a los beta-lactámicos.

Tabla 53.- Características de las cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina aisladas a partir de los cerdos sanos de las granjas relacionadas con el caso clínico 4.

Cepa	Animal	Especie	SCCmec	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia
C2376	6	<i>S. sciuri</i>	III	TET, LIN, CLI ¹ , FUS ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>lnu(A)</i>
C2377	7	<i>S. sciuri</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI, FUS ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(B)</i>
C2378	8	<i>S. sciuri</i>	III	TET, MUP, CIP ¹ , LEV ¹ , FUS ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i>
C2379	9	<i>S. sciuri</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI, MUP, FUS ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>mecA</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i>
C2380	10	<i>S. sciuri</i>	III	TET, ERI, LIN, CLI, MUP, FUS ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(B)</i>

^aTET, tetraciclina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; MUP, mupirocina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; FUS, ácido fusídico.

Caso clínico 5:

En el caso clínico número 5 se obtuvo una cepa de SARM CC398 (C2767) a partir del exudado ótico de la paciente. La paciente no tenía relación laboral con animales y, ni ella ni su marido, resultaron ser portadores nasales de SARM. No obstante, su padre con el que no convivía, sí había sido granjero de cerdos hacía ya 10 años y su muestra nasal fue positiva para SARM (cepa C2877).

Por lo tanto, a partir del caso clínico número 5 se obtuvieron 2 cepas SARM CC398-t108: una de ellas a partir del exudado ótico de la paciente y otra a partir de la muestra nasal de su padre (**Tabla 54**). Ambas cepas presentaron idénticas características fenotípicas y genotípicas. Las dos fueron resistentes, aparte de a beta lactámicos, sólo a tetraciclina. Se detectaron los genes de resistencia *mecA* y *tet(M)*. Como en el resto de los casos clínicos, estas cepas SARM CC398 no presentaron los genes codificantes de las toxinas: Leucocidina de Pantón-Valentine, Toxina del Síndrome del Shock Tóxico, toxinas exfoliativas A, B, C y D.

Tabla 54.- Características de las 2 cepas de origen humano aisladas a partir del caso clínico 5.

Cepa	Origen	CC/ST/spa/SCCmec/agr	Fenotipo de resistencia ^a	Genotipo de resistencia
C2767	Paciente/exudado ótico	CC398/ST398/t108/V/I	OXA, FOX, TET	<i>mecA</i> , <i>tet(M)</i>
C2877	Padre/nasal	CC398/ST398/t108/V/I	OXA, FOX, TET	<i>mecA</i> , <i>tet(M)</i>

^aOXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; TET, tetraciclina.

Caso clínico 6:

El paciente del caso 6 presentaba una grave foliculitis en la cara y se tomaron, con una semana de diferencia, dos muestras de las lesiones cutáneas de dicho paciente y se aislaron cepas SARM en ambas. El paciente y su hermano trabajaban en una granja de cerdos, y en ambos se obtuvieron cepas SARM de sus muestras nasales. Sus padres, quienes no tenían relación laboral con animales, no resultaron ser portadores de SARM.

Por tanto, un total de 4 cepas SARM fueron obtenidas en el caso clínico número 6. Se aislaron dos cepas de la lesión cutánea (C2878 y C2895), una cepa de la muestra nasal del paciente (C2897) y otra de su hermano (C2898). No se identificaron cepas SARM tras el tratamiento del paciente ni a partir de las muestras nasales de sus padres.

Todas las cepas aisladas presentaron las mismas características fenotípicas y genotípicas siendo resistentes a tetraciclina, macrólidos y lincosamidas y mostraron sensibilidad disminuida a quinolonas. Se detectaron los genes de resistencia *mecA*, *tet(K)*, *tet(M)* y *erm(C)*. Las cuatro cepas pertenecieron al CC398 y mostraron el tipo de *spa* t1451 (**Tabla 55**). Además, no poseían ninguno de los genes de virulencia estudiados (*lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*).

Se analizaron las muestras nasales de 9 cerdos sanos de la granja relacionada con este caso clínico y todos los animales resultaron estar colonizados por SARM. Las 4 cepas de origen humano y las 9 de origen animal presentaron idénticas características fenotípicas y genotípicas.

Todas las cepas tanto de origen humano como animal fueron analizadas por PFGE y se detectó un único patrón A con 5 subtipos, los cuales solo se diferenciaron por una, dos o tres bandas (**Figura 24**). Esto sugiere la transmisión de SARM CC398 del animal al hombre.

Tabla 55.- Características de las 13 cepas de origen humano y animal aisladas a partir del caso clínico 6.

Cepa	Origen	CC	ST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec</i>	<i>agr</i>	Patrón PFGE	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia
CEPAS CLÍNICAS								
C2878	Cara	CC398	ST398/t1451	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2895	Cara	CC398	ST398/t1451	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
CEPAS NASALES								
C2897	Paciente	CC398	ST398/t1451	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2898	Hermano	CC398	ST398/t1451	V	I	A3	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
CEPAS NASALES DE ANIMALES								
C2950	Animal 1	CC398	ST398/t1451	V	I	A4	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2951	Animal 2	CC398	ST398/t1451	V	I	A4	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2952	Animal 3	CC398	ST398/t1451	V	I	A4	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2953	Animal 4	CC398	ST398/t1451	V	I	A4	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2954	Animal 5	CC398	ST398/t1451	V	I	A4	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2955	Animal 6	CC398	ST398/t1451	V	I	A5	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2956	Animal 7	CC398	ST398/t1451	V	I	A5	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2657	Animal 8	CC398	ST398/t1451	V	I	A5	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>
C2958	Animal 9	CC398	ST398/t1451	V	I	A4	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tet(K), tet(M), erm(C)</i>

^aTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; ¹Resistencia intermedia.

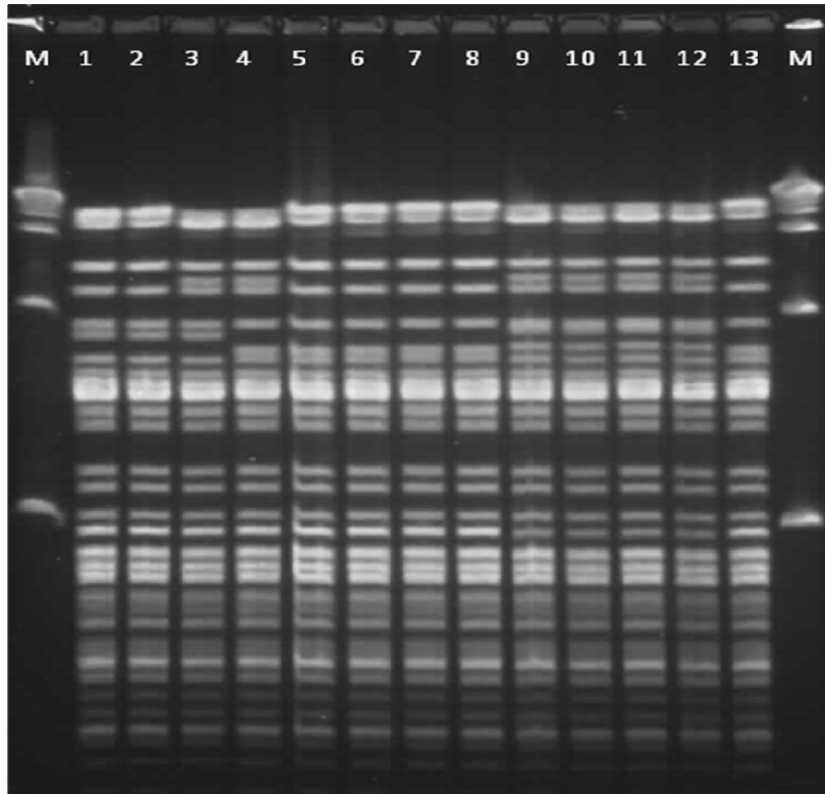


Figura 24. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del paciente, su hermano y de los animales del caso clínico 6. Líneas 1 y 2, A1; línea 3, A2; línea 4, A3; líneas 5-8 y 13, A4; líneas 9-12, A5. M: marcador de peso molecular λ Ladder.

Caso clínico 7:

Se trata de un grave caso de empiema causado por SARM CC398 en el que se obtuvieron del paciente cepas SARM en las muestras de líquido pleural (C2355) y de bronco-aspirado (C2634). Dicho paciente ayudaba esporádicamente en una granja de cerdos donde trabajaban sus dos hijos. Él y uno de sus hijos fueron portadores nasales de SARM (cepas C2634 y C2664, respectivamente), mientras su mujer y el otro hijo no.

Se obtuvieron, por tanto, tres cepas a partir de las muestras del paciente (líquido pleural, broncoaspirado y muestra nasal) y una a partir de la muestra nasal de su hijo. Las 4 cepas SARM CC398 obtenidas presentaron el mismo tipo de *spa* (t011), el mismo tipo de *SCCmec* (tipo V) y de *agr* (tipo I). El fenotipo y genotipo de resistencia también fue similar en todas ellas, siendo resistentes a tetraciclina, lincosamidas y quinolonas. Al igual que ocurrió en los casos 2 y 4, se identificó el perfil de resistencia inusual consistente en sensibilidad a macrólidos y resistencia a lincosamidas. En este

caso, este fenotipo se debió a que las cepas portaban el gen *vga(A)*. Se estudió la CMI de una de las cepas (C2355) a clindamicina y lincomicina y los valores fueron 8 mg/L y 64 mg/L, respectivamente.

A partir de los 18 animales sanos estudiados de la granja de cerdos relacionada con el caso 7 se aislaron 9 cepas SARM. Todas las cepas obtenidas de los animales excepto una, fueron SARM CC398-t011. La cepa restante presentó el tipo de *spa* t1451. Las 9 cepas tenían el tipo de SCC*mec* V y el *agr* tipo I (**Tabla 56**). Si las comparamos con las detectadas en el paciente y en su hijo, todas ellas tenían las mismas características fenotípicas siendo resistentes a tetraciclina, lincosamidas y quinolonas. Además, se detectaron los mismos genes de resistencia [*mecA*, *tet(K)*, *tet(M)*, *vga(A)*] y los mismos cambios aminoacídicos en GrlA y GyrA.

Se analizaron por PFGE las cepas SARM obtenidas del paciente, de su hijo y de los cerdos de la granja. Todas ellas presentaron patrones estrechamente relacionados y correspondieron al patrón de PFGE A con distintos subtipos A1, A2 y A3. En este caso la única cepa con el tipo de *spa* (t1451) presentó el mismo subtipo que algunas de las cepas con el tipo t011. La cepa aislada a partir del líquido pleural presentó también el subtipo A1 el cual fue detectado en las muestras nasales del paciente y su hijo y en la mayoría de los cerdos de la granja (**Figura 25**). Esto indica la posible transmisión de cepas entre el animal y el hombre en este caso clínico.

A pesar de la gravedad del caso clínico, todas las cepas fueron negativas a las PCRs para la detección de los genes de virulencia: *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*.

Tabla 56.- Características de las 13 cepas de origen humano aisladas a partir del paciente del caso 7 y de las muestras nasales de él y de su hijo.

Cepa	Origen	CC	ST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec</i>	<i>agr</i>	Patrón	Fenotipo de resistencia a no ctámicos ^a	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:	
									GrlA	GyrA
CEPAS CLÍNICAS										
C2355	Líquido cefalorraquídeo	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2354	Bronco-aspirado	CC398	ST398/t011	V	I	A2	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
CEPAS NASALES										
C2634	Paciente	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2664	Hijo	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
CEPAS NASALES DE ANIMALES										
C2669	Animal 1	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2670	Animal 2	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2694	Animal 3	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2695	Animal 4	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2697	Animal 5	CC398	ST398/t011	V	I	A3	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2698	Animal 6	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2700	Animal 7	CC398	ST398/t011	V	I	A3	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2704	Animal 8	CC398	ST398/t011	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2706	Animal 9	CC398	ST398/t1451	V	I	A1	TET, LIN, CLI, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>vga(A)</i>	S80F	S84L

^aTET, tetraciclina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina.

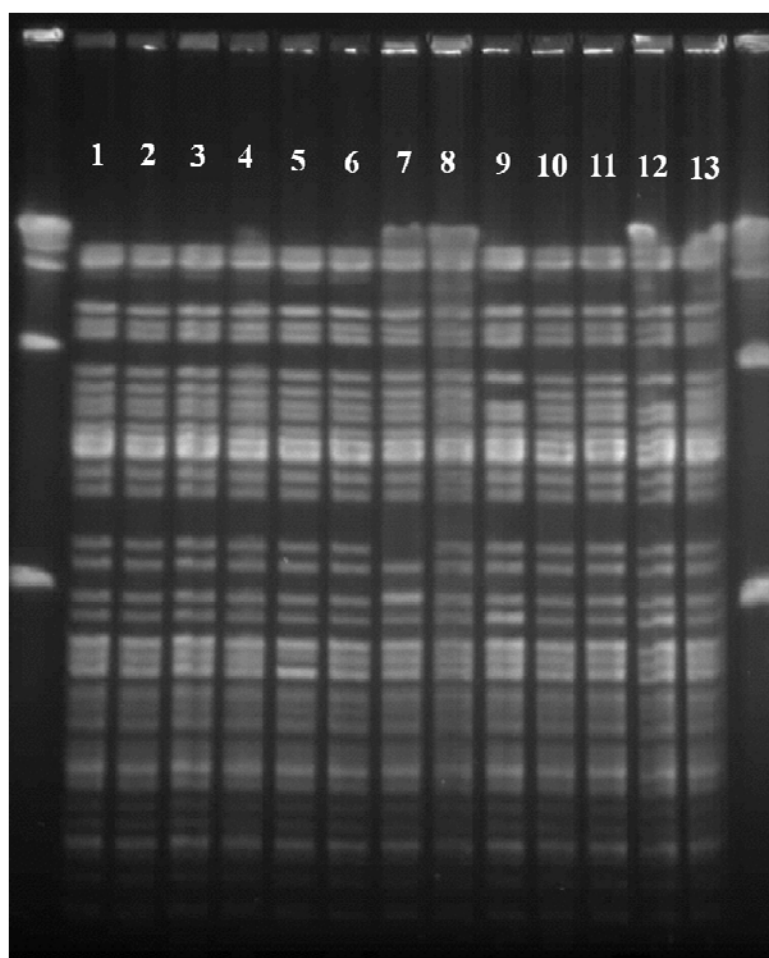


Figura 25. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del paciente y de los animales del caso clínico 7. Líneas 1-6, 8, 10-11 y 13, A1; líneas 7, A2; líneas 9 y 12, A3. M: marcador de peso molecular λ Ladder.

1.1. Estudio sobre la dinámica de colonización en personas en contacto con animales

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de descolonización nasal de la mupirocina en personas en contacto esporádico o más continuo con animales de granja. Para ello se seleccionó el caso clínico número 1, donde tanto la paciente como sus familiares (padre, madre y hermano) resultaron ser portadores nasales de SARM. Se contó con la amable colaboración de todos los miembros de la familia, los cuales se prestaron voluntariamente a la toma de muestras. El aislamiento de las cepas fue llevado a cabo en el Hospital Royo Villanova de Zaragoza bajo la coordinación de la Dra Carmen Aspiroz. Las cepas obtenidas en los diferentes muestreos se indican en la **Tabla**

57. Todos los miembros de la familia vivían muy próximos a una explotación porcina, donde el padre y la madre trabajaban, teniendo la paciente y el hermano un contacto más esporádico con la granja. Los 4 miembros de la familia fueron tratados con mupirocina (1 dosis cada 12 horas durante 7 días) para su descolonización nasal por SARM, y se les sometió a sucesivos controles periódicos. La toma de muestras se realizó en 7 momentos diferentes tras el tratamiento con mupirocina para determinar la presencia de SARM en dichas muestras:

1. Inmediatamente después del tratamiento: 8 de agosto del 2008
2. 48 horas: 10 de septiembre del 2008
3. 4 días: 12 de septiembre del 2008
4. 1 semana: 15 de septiembre del 2008
5. 3 semanas: 3 de marzo del 2008
6. 2 meses: 10 de noviembre del 2008
7. 3 meses: 4 de diciembre del 2008
8. 8 meses: 29 de mayo del 2009

Los resultados de las cuatro primeras tomas fueron negativos en todos los miembros de la familia, obteniéndose cepas SARM a partir de la tercera semana después de la descolonización con mupirocina (5ª toma). El padre y la madre fueron los primeros miembros de la familia en los que se detectó recolonización. Las cepas detectadas en los padres en la 5ª, 6ª, 7ª y 8ª toma de muestras fueron tipadas como CC398-t011, CC398-t108, CC398-t1255, CC398-t1197 y CC1-t127. En la paciente se identificaron cepas SARM en el 6º y 8º muestreo detectándose, en este caso, SARM CC1-t127 y SARM CC398-t108 (**Tabla 57**). El hermano fue el único miembro de la familia en el que no se detectó recolonización por SARM durante el periodo estudiado (8 meses). Todas las cepas SARM CC398 presentaron el tipo de *SCCmec V* y de *agr I*, y las cepas SARM CC1 el tipo de *SCCmec II* y el *agr III*.

Tabla 57.- Cepas SARM obtenidas a partir de las muestras nasales de la paciente y sus familiares antes y después del tratamiento con mupirocina^a.

Muestreo	Fecha	Padre	Madre	Paciente	Hermano
	11/06/08	Aparición del caso clínico			
	17/06/08		NM ^c	NM	1 cepa: C1574
	02/09/08	1 cepa ^b : C1572	2 cepas: C1577, C1578	1 cepa: C1571	1 cepa: C1576
Tratamiento con mupirocina					
1	08/09/08	- ^d	-	-	-
2	10/09/08	-	-	-	-
3	12/09/08	-	-	-	-
4	15/09/08	-	-	-	-
1ª Recolonización					
5	03/10/08	2 cepas: C1661, C1662	3 cepas: C1657, C1658, C1660	-	-
2ª Recolonización					
6	10/11/08	1 cepa: C1698	1 cepa: C1694	1 cepa: C1697	-
3ª Recolonización					
7	04/12/08	2 cepas: C1814, C1815	2 cepas: C1812, C1813	-	-
4ª Recolonización					
8	29/05/09	1 cepa: C1988	2 cepas: C1989, C2015	1 cepa: C1990	

^aEn rojo aparecen las cepas CC398 y en verde las cepas CC1.

^bSe aisló la misma cepa en las dos tomas.

^cNM: No muestra tomada.

^d -: No aislamiento de SARM.

Todas las cepas CC1-t127 fueron resistentes a más de 5 grupos de antibióticos y contenían los genes *mecA*, *tet(K)*, *tet(L)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)/msr(B)*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa* y *dfrK*, así como los cambios aminoacídicos Ser80Phe y Ser84Leu en GrlA y GyrA, respectivamente. Algunas de las cepas CC398-t011 y CC398-t1197 también presentaron un fenotipo de multiresistencia con diferentes genes de resistencia. Como ya ocurrió con las cepas de la lesión y de los animales de la granja, ninguna de las cepas aisladas a partir de las muestras nasales presentaron los genes de virulencia *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*.

Por último, todas las cepas fueron analizadas por PFGE y se obtuvieron 5 patrones diferentes (A-E) y dos subtipos en el patrón A (A1 y A2). Cada tipo de *spa* se correspondió con un patrón: A1/t108, A2/t1255, B/t011, C/t127, D/t1197, y E/t012.

Tabla 58.- Características de las cepas SARM aisladas a partir de las muestras nasales de la paciente y sus familiares tras el tratamiento con mupirocina.

Cepa	Persona muestreada	Periodo ^a	CC/spa	SCCmec	agr	Patrón PFGE	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^b	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:	
									GrlA	GyrA
C1657	Madre	5	CC1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	S80F	S84L
C1658	Madre	5	CC398/t011	V	I	B	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	NR ^c	NR
C1660	Madre	5	CC398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i>	NR	NR
C1694	Madre	6	CC1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	S80F	S84L
C1812	Madre	7	CC1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	S80F	S84L
C1813	Madre	7	CC398/t1197	V	I	D	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT, CIP ^l , LEV ^l	<i>mecA</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	NP	NP
C1989	Madre	8	CC1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	S80F	S84L

Tabla 58.- Continuación

Cepa	Persona muestreada	Periodo ^a	CC/spa	SCCmec	agr	Patrón PFGE	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^b	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:	
									GrlA	GyrA
C2015	Madre	8	CC398/t1197	V	I	D	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	NP	NP
C1661	Padre	5	CC398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>dfrK</i>	Salvaje ^d	Salvaje
C1662	Padre	5	CC398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i>	NP	NP
C1698	Padre	6	CC398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i>	NP	NP
C1814	Padre	7	CC398/t1255	V	I	A2	TET, ERI, LIN, CLI	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i>	NP	NP
C1815	Padre	7	CC398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i>	NP	NP
C1988	Padre	8	CC398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i>	NP	NP
C1697	Paciente	6	CC1/t127	II	III	C	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>dfrK</i>	S80F	S84L
C1990	Paciente	8	CC398/t108	V	I	A1	TET, ERI, LIN, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i>	NP	NP

^a5, 03/10/08; 6, 10/11/08; 7, 04/12/08; 8, 29/05/09.

^bTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia.

^cNR: No Realizado (se trata de cepas sensibles a quinolonas).

^dSalvaje: no se han detectado mutaciones.

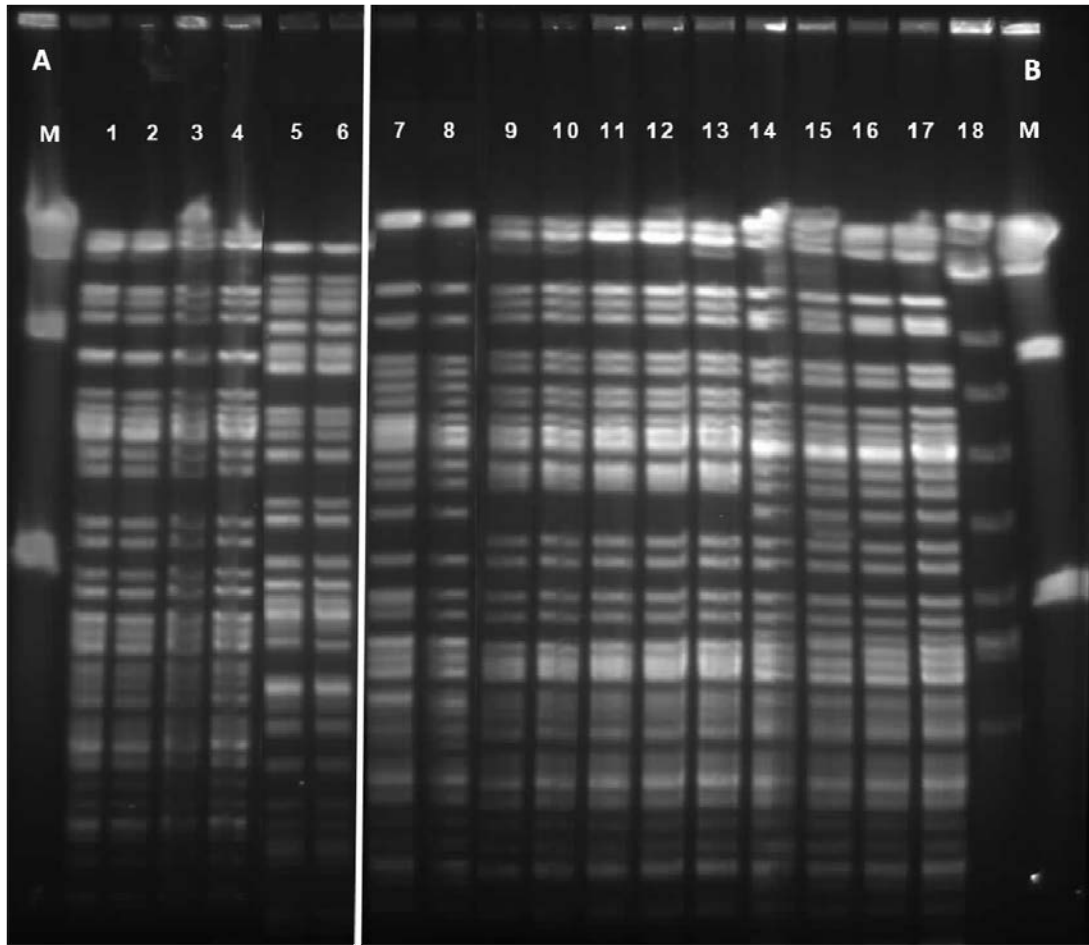


Figura 26. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir del caso clínico número 1. Gel A: líneas 1-4, CC398-t1255 (A2); líneas 5-6, CC1-t127 (C). Gel B: líneas 7-8, CC398-t011 (B); líneas 9-13, CC398-t108 (A1); líneas 14-17, CC398-t1197 (D); línea 18: CC188-t012 (E). M: marcador de peso molecular λ Ladder.

2. PREVALENCIA DE SARM EN MUESTRAS ALIMENTARIAS DE ORIGEN ANIMAL

Se estudió la prevalencia de cepas SARM en alimentos de origen animal, para poder determinar el grado de diseminación de este tipo de microorganismo resistente. Para ello se estudiaron 318 muestras de diferentes productos cárnicos. Se detectaron cepas SARM en 5 de ellas (1,6%) de distinto origen: cerdo, pollo, conejo, ternera y jabalí (Tabla 59).

Tabla 59.- Prevalencia de cepas SARM según el origen de las muestras.

Origen	Nº muestras estudiadas	Nº muestras SARM+	% muestras SARM+
Pollo	148	1	0,7
Cerdo	55	1	1,8
Ternera	46	1	2,2
Cordero	18	0	0
Pavo	10	0	0
Conejo	8	1	12,5
Oveja	1	0	0
Picada: Ternera+Cerdo	8	0	0
Picada: Pollo+Pavo	4	0	0
Caza	20	1	5
Total	318	5	1,6

Las dos cepas SARM aisladas a partir de una muestra de cerdo y de ternera, pertenecieron a la secuencia tipo ST398, su tipo de SCC_{mec} fue el V y su *agr* fue tipo I. El tipo de *spa* de la cepa de cerdo fue t011 y la cepa de ternera fue tipada como *spa* t1197. Ambas cepas presentaron patrones de PFGE diferentes (A y B). Las dos cepas SARM ST398 fueron resistentes a tetraciclina, eritromicina, clindamicina y aminoglucósidos. Se detectó el gen *tet(K)* en ambas, y se identificaron también los genes *tet(M)* (en la cepa con tipo de *spa* t011) y *tet(L)* (en la cepa con tipo de *spa* t1197). La cepa C1894 fue, además, resistente a quinolonas (Tabla 60).

Las dos cepas aisladas a partir de las muestras de pollo y de conejo correspondieron con la ST125, el tipo de *spa* t067 y presentaron patrones de PFGE

altamente relacionados (C1 y C2). Su SCC*mec* fue tipo IVa, su *agr* tipo II y ambas fueron resistentes a aminoglucósidos y a quinolonas. Una de ellas mostró también resistencia a macrólidos y lincosamidas. La cepa aislada a partir de la muestra de jabalí fue tipada como ST217-t032-SCC*mec*IVa-*agr*I y mostró un patrón de campos pulsados diferente a los hallados en las demás cepas (D). Aparte de a betalactámicos, sólo presentó resistencia a quinolonas (**Tabla 60**). Las tres cepas resistentes a quinolonas mostraron los cambios aminoacídicos Ser80Phe en GrlA y Ser84Leu en GyrA. La **Tabla 61** muestra las CMIa a algunos antibióticos de las cepas aisladas de alimentos.

Ninguna de las cepas obtenidas a partir de muestras alimentarias presentó los genes de virulencia *lukF-PV/lukS-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*. Sólo se detectaron genes codificantes de enterotoxinas en las cepas SARM ST125, en las cuales se identificó el operón *egc* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* y *seo*). Todas las cepas presentaron los genes codificantes de hemolisinas *hla*, *hlb* y *hld*. El gen *hlg* se encontró en las cepas SARM CC398 y el gen *hlg_v* en las cepas SARM ST125 y ST217.

Tabla 60.- Características de las cepas SARM aisladas a partir de las muestras alimentarias de origen animal.

Cepa	Origen	CC/ST/spa	SCCmec	agr	PFGE	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^a	Genotipo de resistencia	Cambio aminoacídico:		Citotoxinas	Toxinas pirogénicas superantígenos
								GrlA	GyrA		
C1891	Cerdo	CC398/ST398/t011	V	I	A	TET, ERI, LIN, CLI, STR	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i>	NR	NR	<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i>	ninguna
C1894	Ternera	CC398/ST398/t011	V	I	B	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN ¹ , CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i>	S80F	S84L	<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i>	ninguna
C1532	Pollo	CC5/ST125/t067	IVa	II	C1	TOB, KAN, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i>	S80F	S84L	<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> ,	[<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>]
C1533	Conejo	CC5/ST125/t067	IVa	II	C2	TOB, KAN, ERI, LIN, CLI, KAN, CIP, LEV	<i>mecA</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)/msr(B)</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i>	S80F	S84L	<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> ,	[<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>]
C1890	Jabalí	CC217/ST217/t032	IVa	I	D	CIP, LEV	<i>mecA</i>	S80F	S84L	<i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> ,	ninguna

^aTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; ¹Resistencia intermedia. ^bNR: No Realizado (cepa sensible a quinolonas).

Tabla 61.- Valores de CMI obtenidos en las cepas SARM aisladas a partir de las muestras alimentarias de origen animal.

Cepa	CMI (mg/L) ^a									
	OXA	FOX	TET	ERI	CLI	TOB	KAN	STR	CIP	LEV
C1891	8	16	128	>256	>128	0,25	2	256	0,125	0,125
C1894	64	32	128	>256	>128	32	32	8	2	0,25
C1532	128	128	0,25	0,25	0,06	>256	128	8	64	4
C1533	128	128	0,25	>256	>128	>256	128	8	64	4
C1890	32	32	0,125	0,25	0,06	0,25	2	8	16	4

^aOXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina.

3. PREVALENCIA DE SARM Y SASM EN MUESTRAS NASALES DE VOLUNTARIOS SANOS

Para determinar el grado de colonización nasal por SARM y SASM en personas sanas, se estudiaron las muestras nasales de 278 voluntarios sanos durante el periodo Abril a Diciembre del 2009 en la Comunidad Autónoma de La Rioja.

Se aisló una cepa de SARM en una de las 278 muestras (0,4%). Esta cepa (C2674) contenía el gen *mecA*, fue tipada como ST1649-t701-SCC*mecIVc-agrI* y resultó sensible a los todos los antibióticos no beta-lactámicos estudiados. Con el fin de determinar si la persona era portadora transitoria o permanente de SARM, se tomó una nueva muestra nasal 9 meses después y se obtuvo una cepa con similares características. También se decidió muestrear a su marido y a su hijo, y en ninguno de ellos se detectaron cepas SARM ni SASM.

Para analizar la prevalencia de SASM en individuos sanos, las muestras nasales se sembraron también en placas de MSA. Se aislaron cepas de *S. aureus* en 53 de las 278 muestras nasales (19%) y se caracterizó una cepa por muestra. De las 53 cepas, 52 fueron SASM y 1 fue SARM. La cepa de SARM fue obtenida de la misma muestra que la cepa C2674 (recogida en medio ORSAB) y presentó el mismo perfil fenotípico y genotípico. Por ello, de esta muestra, sólo la cepa C2674 fue incluida en el estudio. Las características de las 53 cepas de *S. aureus* se muestran en la **Tabla 63**.

Todas las cepas de *S. aureus*, excepto cuatro, fueron resistentes a penicilina (92,5%) y sólo la cepa C2674 presentó el gen *mecA* y mostró resistencia a oxacilina y cefoxitina. Se detectó el fenotipo MLS_B inducible en 11 cepas SASM (20,8%) y se identificaron diferentes combinaciones de los genes de resistencia *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)* y/o *msr(A)/msr(B)*. Dos cepas mostraron sensibilidad disminuida a quinonolas por el método del antibiograma, y una de ellas (C2550) presentó los cambios aminoacídicos Ser80Phe en GrlA y Ser84Leu en GyrA. En la otra cepa (C2556) sólo se detectó un cambio (Pro144Ser) no incluido en la región QRDR (Quinolone-Resistance-Determining-Region) en GrlA. Se estudió la sensibilidad a ciprofloxacina por el método dilución en agar y se obtuvieron los siguientes valores de CMI: 8 mg/L (C2550) y 2 mg/L (C2556). No se detectaron cepas resistentes al resto de antibióticos estudiados.

Por otro lado, aunque se identificó una gran variedad de factores de virulencia, no se detectaron los genes de la toxina LPV. Cabe destacar que 15 de las cepas (28,3%) contenían el gen de la TSST (*tst*) y dos cepas (3,8%), el gen de la toxina exfoliativa A (*eta*) (**Tabla 63**). Los genes codificantes de las hemolisinas alfa y delta (*hla* y *hld*) fueron detectados en la mayoría de las cepas y los genes de las hemolisinas beta, gamma y gamma variante, aproximadamente en la mitad de ellas (*hlb*, *hlg* y *hlg-2*). Alguno de los genes codificantes de enterotoxinas se identificaron en 37 de las 53 cepas de *S. aureus* (69,8%). Treinta y dos de las 53 cepas, contenían el operón *egc* completo (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* y *seu*) o dicho operón sin la presencia del gen *seo*, o con la presencia del gen *seu* (*egc*-like). No se identificaron los genes *see*, *etb* y *etd* en ninguna de las cepas aisladas (**Tabla 64**).

Se detectaron una gran variedad de tipos de *spa* (37 tipos), siendo los más frecuentes t012 (identificado en 6 cepas) y t002 (detectado en 5 cepas). Además, se detectaron 5 tipos de *spa* nuevos que se incluyeron en la base de datos de Ridom (t6092, t6287, t6288, t6289 y t6647). Las cepas con estos nuevos tipos de *spa* pertenecieron respectivamente a las siguientes secuencias tipo: ST34, ST30, ST121, ST12 y ST97. Los tipos de *spa* Se obtuvieron cepas positivas para los cuatro tipos de locus *agr* en la siguiente proporción: *agr* tipo I (30,2%), II (30,2%), III (34%) y IV (5,6%).

La técnica del tipado por MLST se llevó a cabo en 30 cepas seleccionadas por presentar tipos de *spa* inusuales, ser resistentes a meticilina, o contener genes codificantes de destacables factores de virulencia. De esta forma, las 15 cepas que portaban el gen *tst* fueron tipadas (**Tabla 62**), y 11 de ellas pertenecieron al complejo clonal CC30. Nueve de estas cepas fueron ST30 y una de ellas presentó un nuevo tipo de *spa* (t6287). Otra fue ST34 que difiere del ST30 sólo en el alelo del gen *arcC* y que tenía también un nuevo tipo de *spa* (t6092). La cepa restante presentó una nueva secuencia tipo ST1731, que es un SLV (Single Locus Variant) de ST30. Esta nueva secuencia tipo, ST1731, presenta una mutación (A4G) en el gen *pta* que da lugar a un cambio aminoacídico (Thr2Ala). Las restantes cuatro cepas que contenían el gen *tst* fueron adscritas a las STs ST509, ST1498, ST59 y una nueva secuencia tipo ST1732. Esta nueva ST presenta un nuevo alelo del gen *pta*, el 187, el cual difiere del alelo ancestral (alelo 44) en varias mutaciones que dan lugar a dos cambios aminoacídicos, Ala19Thr y Asp44Glu. Las dos cepas que portaban el gen *eta* también fueron estudiadas

por MLST y el resultado fue ST121 y ST1141 que correspondieron con los complejos clonales CC121 y CC109, respectivamente.

Tabla 62.- Complejos Clonales y Secuencias Tipo detectadas en las cepas *tst* positivas y sus variaciones alélicas^a.

CC	ST	Nº de cepas	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>
CC30	ST30	9	2	2	2	2	6	3	2
CC30	ST34	1	8	2	2	2	6	3	2
CC30	ST1731	1	2	2	2	2	186	3	2
CC59	ST59	1	19	23	15	2	19	20	15
CC509	ST509	1	1	26	28	18	18	33	27
Singleton	ST1732	1	13	20	1	2	187	91	37
CC8	ST1498	1	3	3	1	1	1	4	3

^aEn verde aparece el alelo que distingue el ST34 del ST30 y en rojo los alelos y los STs nuevos.

También se estudiaron por MLST aquellas cepas que presentaron tipos de *spa* nuevos, detectándose las siguientes STs: ST12 (en una cepa con tipo de *spa* t6289) y ST97 (en dos cepas con el tipo de *spa* t6647). Se detectó también la secuencia tipo ST398 en dos cepas SASM con los tipos de *spa* t571 y t1451, las cuales mostraron el fenotipo iMLS_B mediado por el gen *erm*(T). Estas cepas fueron sensibles a oxacilina y tetraciclina. Se determinó la ST de otras seis cepas y se obtuvieron las siguientes asociaciones entre ST y el tipo de *spa* de estas cepas: ST1-t127, ST5-t001, ST15-t084, ST5-t228 y ST1221-t159. Finalmente, en las 23 cepas restantes en las cuales no se llevó a cabo la técnica de MLST se asumió el complejo clonal, asignándolo según el tipo de *spa* detectado (en la **Tabla 63** se indican los CCs de estas cepas entre parentésis). Para ello se tuvieron en cuenta las correspondencias *spa*-CC obtenidas en este estudio y los datos hallados en la bibliografía consultada. Con todo ello, el complejo clonal más frecuentemente detectado fue el CC30 (15 cepas) seguido de CC5 (7 cepas), CC15 (6 cepas) y CC45 (5 cepas).

Tabla 63.- Características de las 53 cepas de *S. aureus* aisladas a partir de las muestras nasales de voluntarios sanos.

Cepa	<i>spa</i>	<i>agr</i>	MLST	CC ^a	Fenotipo de resistencia ^b	Genotipo de resistencia	Citotoxinas	Toxinas pirogénicas superantígenos
C2674	t701	I	ST1649	CC6	PEN-OXA-FOX	<i>mecA</i>	<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>seb, sek</i>
C2547	t1641	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2560	t018	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst, [seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2565	t342	II	ST30	CC30	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>erm(A)</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2610	t6287 ^c	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2632	t2071	III	ST30	CC30	PEN		<i>hld, hlg</i>	<i>tst, seh, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2633	t012	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2680	t012	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2682	t021	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2687	t2147	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld,</i>	<i>tst, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2556	t6092 ^c	III	ST34	CC30	PEN-CIP ^{le}		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst, seh, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2552	t021	I	ST1731 ^d	CC30	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>msr(A)/msr(B), erm(A)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2676	t1318	III	ST1732 ^d	Singleton	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>tst</i>
C2557	t375	III	ST509	CC509	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>erm(A)</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst, sek, seq</i>
C2558	t190	I	ST1498	CC8	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>erm(A), erm(C)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>tst</i>
C2611	t216	I	ST59	CC59	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>msr(A)/msr(B), erm(C)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>tst</i>
C2548	t209	II	ST1141	CC109	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>mrs(A), erm(A)</i>	<i>eta, hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2562	t270	IV	ST121	CC121	PEN		<i>eta, hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2549	t571	I	ST398	CC398	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>msr(A)/msr(B), erm(T)</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	
C2679	t1451	I	ST398	CC398	ERI-CLI ⁱ	<i>erm(T)</i>	<i>hld, hlg</i>	
C2630	t6647 ^c	I	ST97	CC97	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2631	t6647 ^c	I	ST97	CC97	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2561	t6289 ^c	II	ST12	CC12	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>[sec, sel], sep</i>
C2684	t6288 ^c	IV	ST121	CC121	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2691	t159	IV	ST121	CC121	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2677	t127	III	ST1	CC1	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[sea, sek, seq], seh</i>
C2551	t002	II	ST5	CC5	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2554	t002	II	ST5	CC5	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2559	t002	II		(CC5)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2643	t002	II		(CC5)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[sed, sej, ser], [seg, sei, sem, sen, seo, seu] seq</i>
C2683	t002	II		(CC5)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>[sed, sej, ser], [seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2673	t084	II	ST15	CC15	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>erm(A)</i>	<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2563	t084	II		(CC15)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2564	t084	II		(CC15)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2692	t228	II	ST15	CC15	PEN		<i>hla, hld</i>	

Tabla 62.- Continuación.

Cepa	<i>spa</i>	<i>agr</i>	MLST	CC ^a	Fenotipo de resistencia ^b	Genotipo de resistencia	Citotoxinas	Toxinas pirogénicas superantígenos
C2690	t228	II		(CC15)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2553	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>]
C2641	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>]
C2685	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>sea</i> , [<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>]
C2686	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hlg</i>	
C2612	t190	I		(CC8)	PEN-ERI-CLI ⁱ	<i>msr(A)/msr(B), erm(B)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2555	t1008	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	[<i>sec, sel</i>], [<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>]
C2609	t008	I		(CC8)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2628	t331	I		(CC45)	PEN		<i>hld, hlg</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>]
C2629	t331	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hlg</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>]
C2642	t091	I		(CC7)	PEN		<i>hla, hld</i>	<i>sep</i>
C2644	t706	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	[<i>sei, seg, sem, sen, seo, seu</i>]
C2675	t5955	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>]
C2550	t985	II		(CC5)	PEN-CIP ^f		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>]
C2688	t548	II		(CC5)	ERI-CLI ⁱ	<i>erm(C)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	[<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>], <i>sep</i>
C2627	t2949	II		(CC7/CC15)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2681	t122	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>sea</i> , [<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>]
C2689	t233	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>sea</i> , [<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>]

^aDeterminado o supuesto (en el caso de los Complejo Clonales supuestos se hicieron según el tipo de *spa* y en ese caso aparecen entre paréntesis).

^bPEN, penicilina; OXA, oxacilina; FOX, cefoxitina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; CIP, ciprofloxacina; ¹Resistencia intermedia; ⁱinducible.

^cTipo de *spa* nuevo.

^dSecuencia tipo nueva.

^eSe detectó el cambio aminoacídico Pro144Ser en GrlA (fuera de QRDR) y no se detectaron cambios en GyrA.

^fSe detectaron los cambios aminoacídicos Ser80Phe en GrlA y Ser84Leu en GyrA.

Tabla 64.- Genes codificantes de los factores de virulencia PVL, TSST, toxinas exfoliativas y combinación de enterotoxinas identificadas en las 53 cepas de *S. aureus*.

Gen	Cepas positivas		CC ^a (número de cepas)
	número	%	
<i>lukF/lukS-PV</i>	0	0	
<i>tst</i>	15	28,3	CC8 (1), CC30 (11), CC509 (1), CC59 (1), singleton-CC1732 (1)
<i>eta</i>	2	3,8	CC9 (1), CC121 (1)
<i>etb</i>	0	0	
<i>etd</i>	0	0	
<i>sea</i>	7	13,2	CC30 (7)
<i>sea, sek, seq</i>	1	1,9	CC1 (1)
<i>seb</i>	1	1,9	CC6 (1)
<i>seb, sek, seq</i>	0	0	
<i>sec</i>	0	0	
<i>sec, sel</i>	2	3,8	CC97 (1), CC45 (1)
<i>sed, sej, ser</i>	2	3,8	CC5 (2)
<i>see</i>	0	0	
<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	2	3,8	CC45 (2)
<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	12	22,6	CC5 (7), CC30 (1), CC45 (2)
<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>	18	34	CC30 (14), CC121 (3)
<i>seh</i>	3	5,7	CC1 (1), CC30 (2)
<i>sek</i>	2	3,8	CC6 (1), CC509 (1)
<i>sel</i>	0	0	
<i>sem</i>	0	0	
<i>sep</i>	6	11,3	CC5 (4), CC7 (1), CC97 (1)
<i>seq</i>	2	3,8	CC5 (1), CC509 (1)

^aDeterminado o supuesto según el tipo de *spa*.

4. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS SARM DE ORIGEN HOSPITALARIO

4.1. Cepas SARM clínicas no seleccionadas

Se llevó a cabo un estudio comparativo de cepas SARM aisladas en el Hospital San Millán/San Pedro de Logroño, en dos años separados en el tiempo (2001 y 2009), con el fin de conocer las líneas genéticas circulantes y el contenido en genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, así como su evolución temporal. Por otro lado, se quería saber si en cepas SARM clínicas no seleccionadas podríamos encontrar la línea genética CC398.

Se estudió un total de 204 cepas SARM que incluían 103 aisladas en el periodo Enero-Junio del 2001 y 101 en el periodo Enero-Abril del 2009. En estas cepas se identificaron 11 tipos de *spa* diferentes. El tipo de *spa* mayoritario en ambos periodos fue el t067, apareciendo en un mayor porcentaje de cepas del 2001 (93%) que en las del 2009 (71%). El tipo de *spa* t008 también se detectó en cepas de ambos periodos, pero mientras en el 2009 se identificó en el 16% de las cepas, en el 2001 se encontró sólo en el 1%. Los demás tipos de *spa* no se detectaron en cepas de ambos periodos. Así, en el 2001 se identificaron los tipos de *spa* t051 (2%), t1318 (2%), t012 (1%) y t109 (1%), y en el 2009, los tipos de *spa* t002 (5%), t190 (3%), t032 (2%), t2849 (2%) y t024 (2%).

Se llevó a cabo la técnica del MLST en once cepas (una cepa de cada tipo de *spa*) y los STs detectados fueron: ST125 (t067), ST8 (t008, t024, t190, t2849), ST146 (t002), ST228 (t109, t1318), ST247 (t051), ST30 (t012), y ST22 (t032). En el resto de cepas en las que no se determinó el ST, se dedujo su inclusión en un determinado CC según el tipo de *spa* que presentaban y según las asociaciones *spa*-ST halladas en este trabajo y en la literatura consultada. De esta forma, las cepas de este estudio fueron agrupadas en los siguientes CCs (%2001/%2009): CC5 (96/77), CC8 (1/22), CC22 (0/2), CC30 (2/0), CC228 (3/0), y CC247 (2/0). Por tanto, en ninguno de los periodos se identificaron cepas SARM con tipos de *spa* asociados al complejo clonal CC398. En ambos periodos, la mayor parte de las cepas presentaron tipos de *spa* asociados al CC5. Las cepas con tipos de *spa* asociados a CC30, C228 y CC247 aparecieron sólo en 2001 y las asociadas al CC22, sólo en 2009. Destaca el elevado porcentaje de cepas SARM con tipos de *spa* relacionados al complejo clonal CC8 halladas en el año 2009.

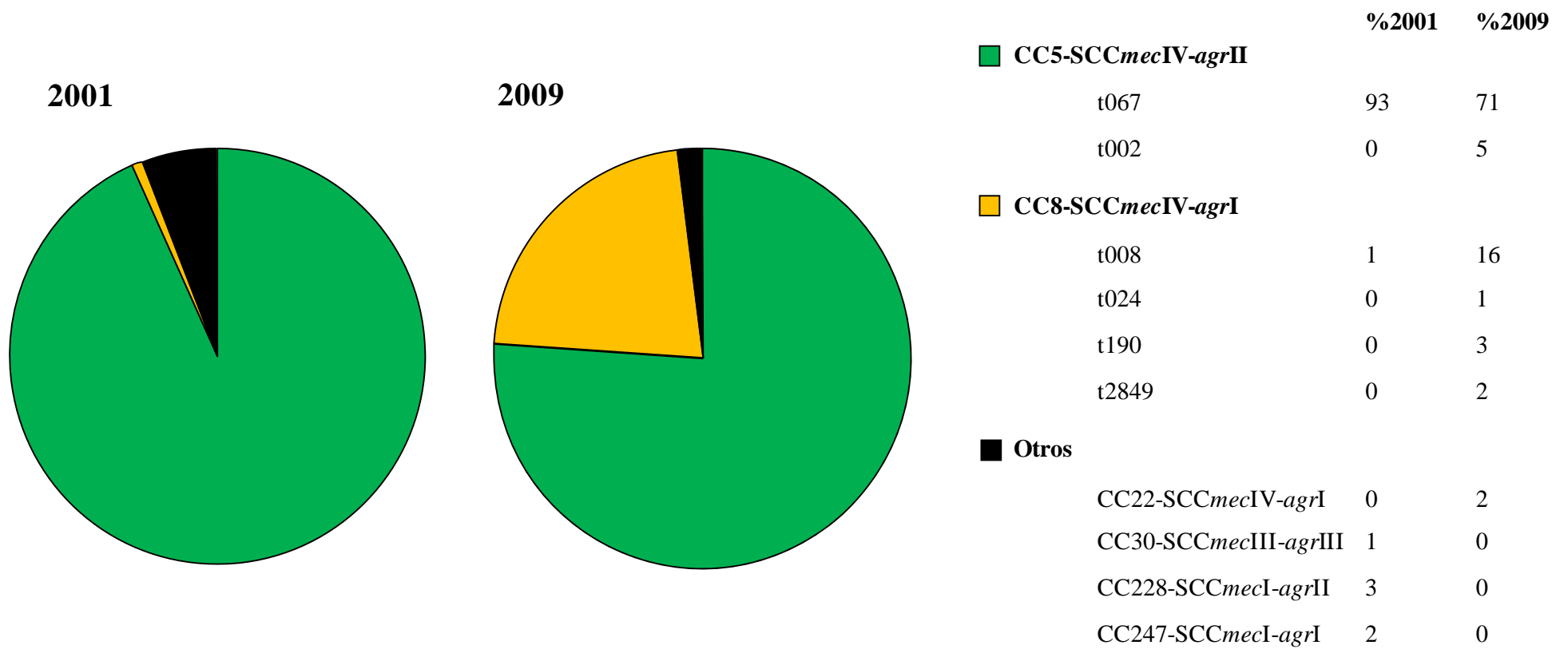


Figura 27. CC-SCCmec-agr y tipos de spa de las cepas de ambos periodos.

En cuanto a los tipos de SCCmec identificados, el más comúnmente detectado fue el tipo IVc, hallándose en el 94% de las cepas del 2001 y en el 97% de las cepas del 2009. Este tipo de SCCmec se asoció a cepas de los complejos clonales CC5, CC8 y CC22. Se encontró otros subtipos del SCCmec IV en un bajo porcentaje de cepas, así el subtipo IVa se obtuvo en dos cepas CC8 (con *spa* t008 y t024) y una nueva variante (IVNv), descrita recientemente, se encontró en una cepa CC5 (con *spa* t002). Se identificaron, además, otros tipos de SCCmec, de manera que las cepas CC30 presentaron el tipo III, y las cepas CC228 y CC247 el tipo I. Se hallaron tres de los cuatro tipos existentes de *agr*, siendo el tipo II el mayoritario. Este tipo se encontró en el 96% y en el 76% de las cepas de los años 2001 y 2009, respectivamente. La proporción obtenida de los otros tipos de *agr* fue la siguiente (%2001/%2009): *agr* I (3/24) y *agr* III (1/0). En la **Figura 27** se muestra la incidencia de CC-SCCmec-*agr* y tipos de *spa* en los diferentes años.

Se analizaron por PFGE 28 de las 204 cepas, una cepa de cada tipo de *spa* y 18 cepas SARM CC5-t067, y se obtuvieron 7 patrones diferentes (A-G), 5 subtipos en el patrón A (A1-A5) y dos subtipos en el patrón C (C1 y C2). La distribución de los patrones y sus subtipos fue la siguiente: A (A1-A5)/CC5-t067, B/CC5-t002, C1/CC8-t008-t190-t2849, C2/CC8-t024, D/CC22-t032, E/CC30-t012, F/CC228-t109-t1318 y G/CC247-t051.

En la **Figura 28** se representa las líneas genéticas detectadas en función del origen de las cepas destacando que se obtuvieron más cepas SARM a partir de muestras de herida en el 2009 que en el 2001, muchas de ellas con tipos de *spa* asociados al CC8.

Además de la resistencia a β -lactámicos, se detectaron resistencias a otros antimicrobianos (**Figura 29**). Los porcentajes detectados en los dos periodos fueron (%2001/%2009): quinolonas (99/87), aminoglucósidos (98/88), macrólidos (32/30), lincosamidas (30/17), tetraciclinas (2/1), mupirocina (0/11), cloranfenicol (0/1) y trimetoprim-sulfametoxazol (1/0). Si comparamos los porcentajes de cepas resistentes de los dos periodos vemos como, en general, permanecen más o menos constantes, con una posible ligera tendencia a la baja en el año 2009.

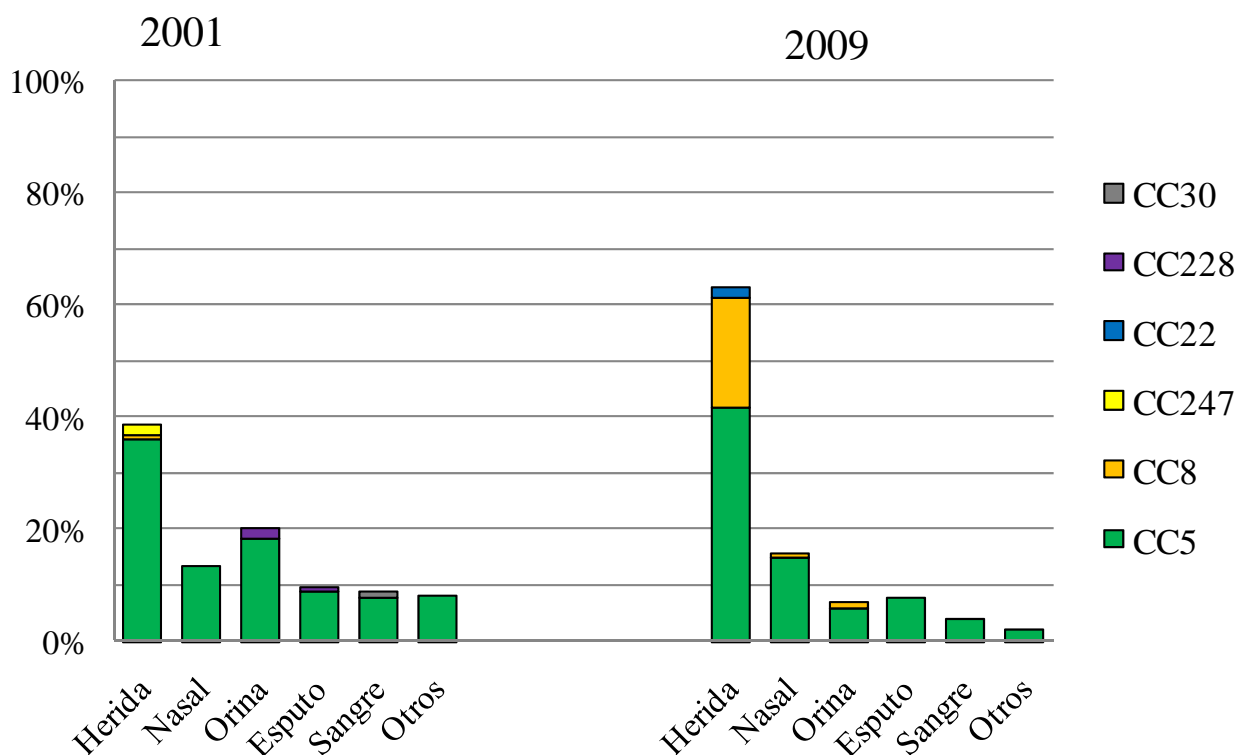


Figura 28. Origen de las cepas y CCs identificados en las cepas del 2001 y del 2009.

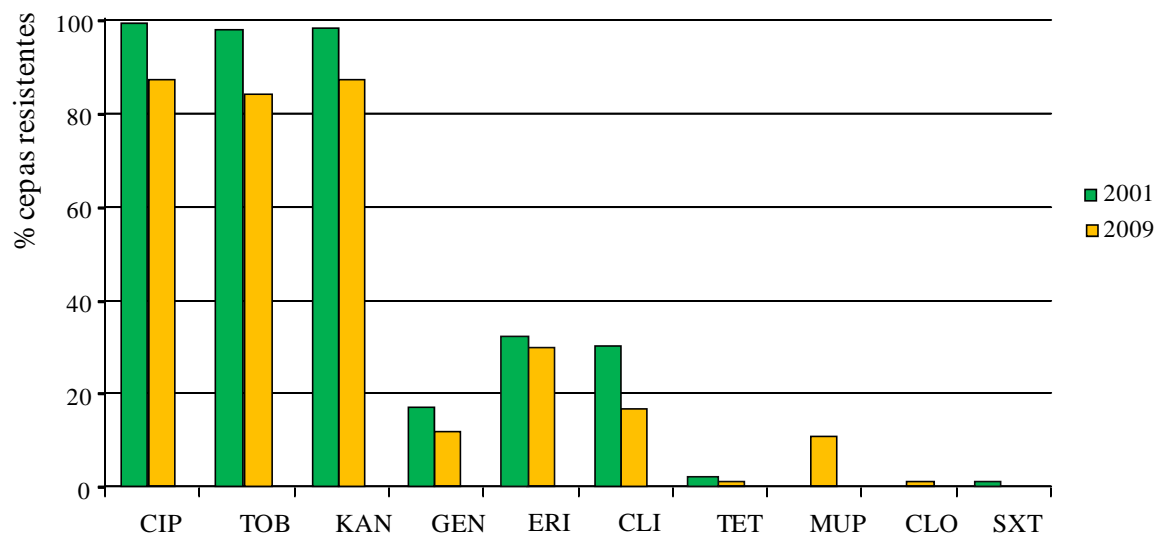


Figura 29. Porcentajes de resistencia detectados en las cepas SARM de cada periodo. CIP, ciprofloxacina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; GEN, gentamicina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; TET, tetraciclina; MUP, mupirocina; CLO, cloranfenicol; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

Por otro lado, sólo se detectó resistencia a trimetoprim en una cepa del 2001 y resistencia a mupirocina y cloranfenicol en algunas cepas del 2009. Además, se identificaron más cepas con fenotipo de multirresistencia en 2001 que en 2009. Ninguna de las 204 cepas SARM mostró resistencia a gluco péptidos (verificado por CMI en las cepas con valores de difusión en disco para estos antibióticos dudoso).

En la **Tabla 65** se muestran los diferentes patrones de resistencia identificados, así como los genes de resistencia asociados en las 204 cepas clínicas SARM estudiadas.

La resistencia a quinolonas se detectó en cepas de todos los CCs identificados en este estudio. Se analizó por PCR y secuenciación la presencia de cambios aminoacídicos en las proteínas GrlA y GyrA en las 13 cepas SARM resistentes a quinolonas procedentes de hemocultivos, y en todas ellas se encontraron los cambios Ser80Phe en GrlA y Ser84Leu en GyrA.

La resistencia a aminoglucósidos fue también muy común, detectándose un porcentaje elevado de cepas resistentes a tobramicina y kanamicina en ambos periodos. No obstante, el porcentaje de cepas resistentes a gentamicina en ambos periodos fue más moderado. La resistencia a aminoglucósidos estuvo mediada por los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(4')-Ia*, y/o *aph(3')-IIIa*, siendo el más frecuente el gen *ant(4')-Ia*.

El nivel de resistencia a macrólidos hallado en las cepas de ambos años fue bastante similar. Sin embargo, el porcentaje de cepas resistentes a lincosamidas en el 2001 (30%) fue casi el doble que el identificado en el 2009 (17%). Este hecho se refleja también en los mecanismos de resistencia observados en las cepas de ambos periodos.

Así, los genes *erm* fueron detectados más frecuentemente en cepas del 2001 que en cepas del 2009. Estos genes de resistencia a macrólidos y lincosamidas aparecieron muchas veces, en cepas del 2001, en combinación con los genes de resistencia a macrólidos *msr(A)/msr(B)*. No obstante, en las cepas del 2009 los genes *msr(A)/msr(B)* se detectaron normalmente o como únicos mecanismos de resistencia, o asociados al gen *mph(C)*. La resistencia a aminoglucósidos, macrólidos y lincosamidas se identificó en cepas pertenecientes a todos los CCs detectados en este estudio exceptuando el CC22.

Tabla 65.- Perfiles de resistencia, genes de resistencia, CCs y tipos de *spa* de las cepas SARM estudiadas^a.

CC ^b (tipos de <i>spa</i>)	Perfil de resistencia ^c	N° de cepas		Genes de resistencia (n° de cepas 2001/n° de cepas 2009)
		2001	2009	
CC5 (t067/t002)	TOB-KAN-CIP	57	38	<i>ant</i> (4')-Ia (57/38), <i>aph</i> (3')-IIIa (5/3)
	GEN-TOB-KAN-CIP	8	3	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (8/5), <i>ant</i> (4')-Ia (7/5), <i>aph</i> (3')-IIIa (0/2)
	ERI-CLI- TOB-KAN-CIP	23	11	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (9/0), <i>mph</i> (C) (2/0), <i>erm</i> (A) (1/0), <i>erm</i> (B) (4/1), <i>erm</i> (C) (19/11), <i>ant</i> (4')-Ia (16/11)
	ERI-CLI- GEN-TOB-KAN-CIP	4	1	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (1/0), <i>erm</i> (A) (4/0), <i>erm</i> (B) (1/0), <i>erm</i> (C) (2/1), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (3/1), <i>ant</i> (4')-Ia (3/1)
	ERI- TOB-KAN-CIP	1	4	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (1/3), <i>mph</i> (C) (1/3), <i>ant</i> (4')-Ia (1/4), <i>aph</i> (3')-IIIa (0/4)
	CIP	1	1	
	ERI- GEN-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (1/0), <i>mph</i> (C) (1/0), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (1/0), <i>ant</i> (4')-Ia (1/0)
	GEN-TOB-KAN-SXT	1	0	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (1/0), <i>ant</i> (4')-Ia (1/0), <i>dfz</i> S1 (1/0)
	ERI- KAN-CIP	0	6	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (0/6), <i>mph</i> (C) (0/4), <i>aph</i> (3')-IIIa (0/6)
	GEN-TOB-KAN-MUP-CIP	0	2	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (0/2), <i>ant</i> (4')-Ia (0/2), <i>mupA</i> (0/2)
	GEN-TOB-KAN -MUP	0	2	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (0/5), <i>ant</i> (4')-Ia (0/5), <i>mupA</i> (0/5)
	ERI-CLI-KAN-CIP	0	1	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (0/1), <i>mph</i> (C) (0/1), <i>erm</i> (B) (0/1), <i>aph</i> (3')-IIIa (0/1)
	Sólo a oxacilina	0	1	
	TOB-KAN	0	1	<i>ant</i> (4')-Ia (0/1)
	ERI-CLI	0	1	<i>erm</i> (C) (0/1)
	ERI-CLI-CIP	0	1	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (0/1), <i>mph</i> (C) (0/1), <i>erm</i> (C) (0/1)
	ERI-CIP	0	1	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) (0/1), <i>mph</i> (C) (0/1)
	TOB-KAN -CIP-MUP	0	1	<i>ant</i> (4')-Ia (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	ERI- TOB-KAN-CIP-MUP	0	1	<i>mph</i> (C) (0/1), <i>ant</i> (4')-Ia (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	ERI-CLI- GEN-TOB-KAN	0	1	<i>erm</i> (A) (0/1), <i>erm</i> (C) (0/1), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (0/1)
CC8 (t008/t024/t190/ t2849)	ERI-CLI-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>erm</i> (C) (1/0), <i>ant</i> (4')-Ia (1/0)
	TOB-KAN-CIP	0	7	<i>ant</i> (4')-Ia (0/7)
	GEN-TOB-KAN-MUP	0	3	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (0/3), <i>ant</i> (4')-Ia (0/3), <i>mupA</i> (0/3)
	CIP	0	2	
	GEN-TOB-KAN-CIP	0	2	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (2/0), <i>ant</i> (4')-Ia (2/0), <i>aph</i> (3')-IIIa (1/0)
	Sólo a oxacilina	0	1	
	TET	0	1	<i>tet</i> (K) (0/1)
	GEN-TOB-KAN	0	1	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia (0/1), <i>ant</i> (4')-Ia (0/1)
	ERI-CLI-TOB-KAN	0	1	<i>erm</i> (C) (0/1), <i>ant</i> (4')-Ia (0/1)
TOB-KAN-CIP-MUP	0	1	<i>ant</i> (4')-Ia (0/1), <i>mupA</i> (0/1)	

Tabla 65.- Continuación.

CC ^b (tipos de <i>spa</i>)	Perfil de resistencia ^c	N° de cepas		Genes de resistencia (n° de cepas 2001/n° de cepas 2009)
		2001	2009	
	ERI-GEN-TOB-KAN-CIP-MUP	0	1	<i>msr(A)/msr(B)</i> (0/1), <i>mph(C)</i> (0/1), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/1), <i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	GEN-TOB-KAN-MUP-CIP	0	1	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	TOB-KAN-CIP-CLO	0	1	<i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>cat_{pc221}</i> (0/1)
CC22 (t032)	CIP	0	2	
CC30 (t012)	ERI-CLI-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (1/0), <i>erm(B)</i> (1/0), <i>erm(C)</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0)
CC228 (t109/t1318)	GEN-TOB-KAN-CIP	2	0	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (2/0), <i>ant(4')-Ia</i> (2/0)
	ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (1/0), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0)
CC247 (t051)	ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-CIP- TET	2	0	<i>tet(M)</i> (2/0), <i>tet(L)</i> (1/0), <i>tet(K)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (2/0), <i>erm(B)</i> (1/0), <i>msr(A)/msr(B)</i> (2/0), <i>aac(6')-Ie- aph(2'')-Ia</i> (2/0), <i>ant(4')-Ia</i> (2/0)

^aEn sombreado aparecen los perfiles de resistencia detectados en ambos periodos.

^bCC asignado según el ST detectado o el tipo de *spa* identificado.

^cTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; CIP, ciprofloxacina; MUP, mupirocina; CLO, clorafenicol; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol.

La resistencia a tetraciclina apareció en un bajo porcentaje de cepas de ambos años. En el 2001 las dos cepas resistentes a este antibiótico fueron SARM CC247-t051. Una de estas cepas portaba los genes *tet(K)*, *tet(L)* y *tet(M)*, y la otra el gen *tet(M)*. La única cepa resistente a tetraciclina del 2009 fue tipada como CC8-t024 y mostró el gen de resistencia *tet(K)*.

Sólo se detectó resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol en una cepa de SARM CC5-t067 del 2001 la cual contenía el gen *df_rS1*.

Por otro lado, es de gran interés la aparición de resistencia a mupirocina en 11 cepas del 2009 las cuales pertenecieron a los complejos clonales CC5-t067 y CC8-t008 y todas ellas portaban el gen *mupA* de resistencia de alto nivel.

Por último, la resistencia a cloranfenicol se identificó sólo en una cepa de SARM CC8-t008 del 2009, la cual portaba el gen *cat_{pc221}*.

Con respecto a los determinantes de virulencia de las 204 cepas clínicas SARM, en la **Tabla 66** se muestran los diferentes perfiles detectados. Todas las cepas SARM portaban el gen *hld*, 203 cepas el gen *hla*, 194 cepas el gen *h1b*, 185 cepas el gen

hlg_v, y cuatro cepas el gen *hlg*. El gen *hlg* se identificó únicamente en cepas del 2001. Además, la mayor parte de las cepas (99%) contenían algún gen codificante de alguna enterotoxina.

En la mayoría de las cepas se observó una asociación entre los genes codificantes de enterotoxinas detectados y los CCs. De este modo, los genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, y *seo* (operón *egc*) se hallaron en cepas CC5, CC22, CC30 y CC228. En algunos casos, el operón *egc* se detectó en cepas que también contenían los genes *seu* (*egc*-like), *sea* o *sep* y una cepa presentó el elemento *egc* y los genes *sed*, *sej* y *ser*. Destaca que el operón *egc*-like se identificó en un mayor número de cepas CC5-t067 del 2001 (31%) que del 2009 (4%).

En la mayoría de las cepas con tipos de *spa* asociados al CC8 se observó la combinación de los genes *sed*, *sej* y *ser*, y en muchas de estas cepas se halló también el gen *sea*. El gen *tst* se detectó únicamente en cepas del 2001, una de ellas perteneció al CC30-t012 y las otras tres fueron cepas CC5-t067. Dos cepas CC8 con tipos de *spa* t008 y t024 fueron positivas para los genes de la PVL y no contenían genes codificantes de enterotoxinas. Ambas cepas fueron aisladas en el 2009 y fueron las únicas que mostraron el tipo de SCC*mec* IVa. Finalmente, las dos cepas CC247 contenían, además de los genes *hla*, *hlb*, *hld*, y *hlg_v*, el gen *sea*.

Tabla 66.- Combinación de los genes de virulencia, CCs y tipos de *spa* de las 204 cepas SARM estudiadas según el año de aislamiento.

CC ^a - <i>spa</i> (2001/2009)	Genes de leucocidinas y hemolisinas	PTSAg	Nº de cepas positivas	
			2001	2009
CC5-t067 (96/72)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	25	22
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep</i>	27	39
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i> -like	17	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i> -like, <i>sep</i>	11	2
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc</i>	4	0
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc, sep</i>	5	1
	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>egc, sep</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc, sep</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc</i> -like, <i>sep</i>	2	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, tst</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep, tst</i>	2	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>		0	1
	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sep</i>	0	1
	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep</i>	0	4

Tabla 66.- Continuación.

CC ^a - <i>spa</i> (2001/2009)	Genes de leucocidinas y hemolisinas	PTSAg	N° de cepas positivas	
			2001	2009
CC5-t002 (0/5)	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc, sep</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sed-sej-ser</i>	0	2
CC8-t008 (1/16)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea, sed-sej-ser</i>	0	13
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>sea, sed-sej-ser</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea</i>	1	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v, lukS/F-PV</i>		0	1
CC8-t024 (0/1)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v, lukS/F-PV</i>		0	1
CC8-t190 (0/3)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea</i>	0	3
CC8-t2849 (0/2)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sep</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sed-sej-ser</i>	0	1
CC22-t032 (0/2)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	0	2
CC30-t012 (1/0)	<i>hlb, hld, hlg</i>	<i>egc-like, tst</i>	1	0
CC228-t109 (1/0)	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc, sea</i>	1	0/0
CC228-t1318 (2/0)	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sea</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc, sea</i>	1	0
CC247-t051 (2/0)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea</i>	2	0

^aCC asignado según el ST detectado o el tipo de *spa* identificado y entre paréntesis aparece el número de cepas totales que pertenecen al correspondiente CC en cada uno de los años.

4.2. Cepas SARM seleccionadas a partir de su fenotipo de resistencia a tetraciclina

Según los datos existentes en bibliografía y los resultados obtenidos en estudios previos realizados en esta tesis, las cepas SARM del complejo clonal CC398 presentan en la mayoría de los casos resistencia a tetraciclina. Por ello, se quiso saber si la resistencia a este antibiótico podría ser un buen marcador para detectar cepas SARM CC398 entre los aislados clínicos hospitalarios. Con este fin, se analizaron los linajes clonales, los mecanismos de resistencia y los factores de virulencia de todas las cepas SARM resistentes a tetraciclina (SARM-TET^R) aisladas en el Hospital Universitario Miguel Servet durante los años 2009 y 2010 (n =52).

Las 52 cepas estudiadas representaban el 8,2% de todas las cepas SARM obtenidas durante esos dos años en dicho hospital y se aislaron a partir de pacientes diferentes. Entre las 52 cepas SARM-TET^R, se identificaron 15 tipos de *spa* diferentes. Dieciséis cepas fueron estudiadas por MLST. En el resto de las cepas, el CC fue asumido según las asociaciones *spa*-ST detectadas y según la información disponible en la bibliografía consultada (**Tabla 67**). De esta forma las 52 cepas se asociaron a 4 complejos clonales distintos: CC398 (el 67,3% de las cepas), CC1 (el 11,5%), CC5 (el 11,5%) y CC8 (el 9,6%).

Treinta y cinco de las 52 cepas presentaron *spa*-types asociados al CC398: t011, t899, t1197, t1451, t3934 y tres tipos de *spa* nuevos registrados con los números t7577, t8100 y t8409. Se tiparon por MLST nueve de estas 35 cepas (una de cada tipo de *spa* y las cuatro cepas con tipos de *spa* nuevos) y siete pertenecieron a la secuencia tipo ST398. Las cepas con tipos de *spa* t8100 y t8409 fueron inicialmente adscritas a la nueva secuencia tipo ST2077 (SLV de ST398). No obstante, debido a modificaciones recientes de la página web del MLST (<http://saureus.mlst.net/>) las cuales afectan a la región considerada para determinar los alelos del gen *gmk*, estas cepas son ahora tipadas como ST398. Aunque cepas del CC398 suelen estar asociadas a infecciones de piel y partes blandas, en este estudio cepas de este linaje clonal fueron aisladas de muestras de diferentes orígenes (**Tabla 67**). La mayor parte de ellas se detectaron en muestras de heridas de piel o del tracto respiratorio. Sin embargo, cuatro de estas cepas (11,4%) se aislaron de muestras de sangre, líquido pleural u orina.

De las 17 cepas SARM-TET^R restantes, seis pertenecieron al CC1 (*spa* t127 y t1381), seis al CC5 (*spa* t002, t067 y t2220) y cinco al CC8 (*spa* t008 y t7613). Estos datos junto con las STs, el tipo de SCC*mec* y el tipo de *agr* se muestran en la **Tabla 67**.

En cuanto a los genes de resistencia a tetraciclina la mayor parte de las cepas SARM CC398 contenían los genes *tet(K)* y *tet(M)*. Solo siete cepas con los tipos de *spa* t011, t899, t1451 y t8100 portaban el gen *tet(L)* (**Tabla 68**). En las cepas SARM-t127 se detectó el gen *tet(K)* sólo o la combinación de este gen con el gen *tet(L)*. La combinación de los genes *tet(M)* y *tet(K)* se identificó en las cepas SARM-t067. Sin embargo, las restantes cepas SARM CC5 contenían sólo el gen *tet(M)*.

Además de la resistencia a tetraciclina se detectó resistencia a otros antibióticos. Más de la mitad de las cepas fueron resistentes a macrólidos, lincosamidas

o quinolonas (50-58%) y portaban los genes de resistencia *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)*, *msr(A)/msr(B)* y/o *mph(C)*. Este último fue únicamente identificado en cepas SARM-t067. Dos de las cepas (C2944 y C2931) presentaron sensibilidad a eritromicina y resistencia a lincomicina, fenotipo de resistencia poco habitual. Los mecanismos responsables de este fenotipo fueron los codificados por los genes *lnu(B)* y *vga(A)*. Se determinaron los valores de CMI de clindamicina y lincomicina de ambas cepas y se obtuvieron los siguientes valores respectivamente: 8 mg/L y 128 mg/L (C2944) y 4 mg/L y 64 mg/L (C2931). Se estudió la presencia de mutaciones en GrlA y GyrA en todas las cepas resistentes a quinolonas, y todas ellas mostraron el cambio aminoacídico Ser80Phe en GrlA. En GyrA, sin embargo, se identificaron diferentes sustituciones: 19 cepas presentaron el cambio Ser84Leu, dos cepas Ser84Ala y tres cepas Glu88Gly. Todas las cepas con el cambio aminoacídico Glu88Gly en GyrA pertenecieron al tipo de *spa* t1197. Dos cepas sólo presentaron sustitución en GrlA, no mostrando ningún cambio en GyrA.

Veinticinco cepas de diferentes CCs fueron resistentes a aminoglucósidos y contenían los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(4')-Ia* y/o *aph(3')-IIIa*. Sólo cinco cepas mostraron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, dos cepas SARM CC5 que portaban el gen *dfrS1* y tres cepas SARM CC398 que poseían el gen *dfrK*. Una cepa, mostró sensibilidad disminuida a linezolid pero no se detectó ni el gen *cfr*, ni mutaciones en el ARNr 23S, ni cambios aminoacídicos en las proteínas L3, L4 y L22.

Dos cepas SARM-t008 (C2947, C4115) y una de SARM-t7613 (C2936) fueron positivas para los genes de LPV y no se detectaron los genes *tst*, *eta*, *etb* y *etb*. Se estudió la presencia del gen *cna*, y 41 cepas fueron positivas, todas ellas tipadas como CC1 y CC398.

Tabla 67.- Tipado molecular de las 52 cepas SARM resistentes a tetraciclina aisladas en el Hosp.. Miguel Servet de Zaragoza en 2009-2010.

Número de cepas	CC ^b	<i>spa</i>	ST ^a	SCC ^{mec}	<i>agr</i>	Origen (número de cepas)
24	CC398	t011	ST398	V	I	aspirado (10), herida (7), frotis nasal (4), sangre (1), líquido pleural (1), orina (1)
1	CC398	t899	ST398	IVa	I	aspirado (1)
3	CC398	t1197	ST398	V	I	herida (2), frotis nasal (1)
1	CC398	t1451	ST398	V	I	frotis nasal (1)
2	CC398	t3934	ST398	V	I	frotis nasal (2)
1	CC398	t7577 ^c	ST398	V	I	sangre (1)
1	CC398	t8409 ^c	ST398	V	I	aspirado (1)
1	CC398	t8100 ^c	ST398	IVa	I	herida (1)
1	CC398	t8409 ^c	ST398	V	I	frotis nasal (1)
5	CC1	t127	ST1	IVa	III	herida (2), aspirado (1), frotis nasal (1), vaginal (1)
1	CC1	t1381	ST1	IVa	III	herida (1)
1	CC5	t002	ST5	IVa	II	herida (1)
3	CC5	t067	ST125	IVc	II	herida (2), aspirado (1)
2	CC5	t2220	ST125	IVc	II	sangre (1), herida (1)
4	CC8	t008	ST8	IVa	I	herida (2), sangre (1), frotis nasal (1)
1	CC8	t7613 ^c	ST94	NT ^e	I	sangre (1)

^aLa técnica de MLST se llevó a cabo en una cepa de cada tipo de *spa* y en las dos cepas con el nuevo tipo de *spa* t8409.

^bEl complejo clonal fue asignado según las secuencias tipo determinadas y/o los tipos de *spa* detectados.

^cTipo de *spa* nuevo.

^eNT, no tipable.

Tabla 68.- Fenotipo y genotipo de resistencia de las 52 cepas SARM resistentes a tetraciclina y su relación con los complejos clonales y los tipos de *spa* detectados.

CC ^a / <i>spa</i>	Cepa	Fenotipo de resistencia a no beta- lactámicos ^b	Genes de resistencia a tetraciclina	Otros genes de resistencia	Cambios aminoacídicos:	
					GrlA	GyrA
CC398/t011	C2925	TET	<i>tet(K), tet(M)</i>		NR ^d	NR
	C2935	TET	<i>tet(K), tet(M)</i>		NR	NR
	C3447	TET	<i>tet(K), tet(M)</i>		NR	NR
	C3676	TET	<i>tet(K), tet(M)</i>		NR	NR
	C3443	TET	<i>tet(K), tet(M)</i>		NR	NR
	C2927	TET, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>		S80F	S84A
	C2939	TET, CIP	<i>tet(M)</i>		S80F	S84L
	C3340	TET, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>		S80F	S84L
	C3448	TET, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>		S80F	S84L
	C3455	TET, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>		S80F	S84L
	C4154	TET, ERI, LIN, CLI	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	NR	NR
	C3449	TET, ERI, LIN, CLI, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	S80F	S84L
	C2943	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(C), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	S80F	S84L
	C2933	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, CIP	<i>tet(M)</i>	<i>erm(C), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	S80F	Salvaje
	C3445	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(C), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	NR	NR
	C3446	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(C), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, dfrK</i>	NR	NR
	C3453	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>	<i>erm(C), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	NR	NR
	C2941	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>	<i>erm(C), erm(T), ant(4')-Ia</i>	NR	NR
	C3450	TET, TOB, KAN, CIP	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>	<i>ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	S80F	S84L
	C4157	TET, TOB, KAN, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	S80F	S84L
	C2940	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, LZD ¹ , CIP	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>	<i>erm(C), erm(T), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, dfrK</i>	S80F	S84L
	C3060	TET, ERI, MUP, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(B), mupA</i>	S80F	S84L
	C2931	TET, LIN, CLI, CIP	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>vga(A)</i>	S80F	S84L
C2944	TET, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, STR, CIP	<i>tet(M)</i>	<i>lnu(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	S80F	S84L	
CC398/t899	C4155	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, CIP	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>	<i>erm(C), ant(4')-Ia</i>	S80F	Salvaje
CC398/t1197	C2930	TET, ERI, LIN, CLI, FUS, CIP	<i>tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	S80F	E88G
	C3451	TET, ERI, LIN, CLI, CIP	<i>tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	S80F	E88G
	C3444	TET, ERI, LIN, CLI, CIP	<i>tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	S80F	E88G
CC398/t1451	C3452	TET, ERI, LIN, CLI, CIP	<i>tet(K), tet(L), tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	S80F	S84L
CC398/t3934	C2928	TET	<i>tet(K), tet(M)</i>		NR	NR
	C2937	TET, ERI, CLI	<i>tet(K), tet(M)</i>	<i>erm(C)</i>	NR	NR

Tabla 68.- Continuación.

CC ^b / <i>spa</i>	Cepa	Fenotipo de resistencia a no beta-lactámicos ^c	Genes de resistencia a tetraciclina	Otros genes de resistencia	Cambios aminoacídicos:	
					GrlA	GyrA
CC398/t7577	C2942	TET, ERI, LIN, CLI, CIP	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	S80F	S84L
CC398/t8100	C3672	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrK</i>	NR	NR
CC398/t8409	C4151	TET	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)		NR	NR
	C4152	TET	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)		NR	NR
CC1/t127	C3677	TET, GEN, TOB, KAN	<i>tet</i> (K)	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia	NR	NR
	C2934	TET, ERI, LIN, CLI, KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa		
	C3338	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, CIP	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa	S80F	S84L
	C3673	TET, ERI, LIN, CLI, KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L)	<i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa		
CC1/t1381	C4156	TET, ERI, LIN, CLI, KAN	<i>tet</i> (K)	<i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa		
	C2932	TET, ERI, LIN, CLI, KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa	NR	NR
CC5/t002	C2949	TET, ERI, CIP	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	S80F	S84L
CC5/t067	C2926	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, SXT, MUP, CIP	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrA</i> , <i>mupA</i>	S80F	S84L
	C2945	TET, ERI, LIN, CLI, KAN, SXT, CIP	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>mph</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>dfrA</i>	S80F	S84L
	C2946	TET, ERI, LIN, CLI, GEN, TOB, KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa	NR	NR
CC5/t2220	C2929	TET, ERI, LIN, CLI, KAN, CIP	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>mph</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa	S80F	S84L
	C2938	TET, ERI, LIN, CLI, TOB, KAN, MUP, CIP	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>mph</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>mupA</i>	S80F	S84L
CC8/t008	C2947	TET	<i>tet</i> (M)		NR	NR
	C4115	TET	<i>tet</i> (K)		NR	NR
	C3454	TET, TOB, KAN	<i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa	NR	NR
	C4149	TET, TOB, KAN	<i>tet</i> (M)	<i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa	NR	NR
CC8/t7613	C2936	TET, ERI, KAN	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa	NR	NR

^aLos complejos clonales han sido asignados según las secuencias tipo determinadas y los tipos de *spa* detectados.

^cTET, tetraciclina; ERI, eritromicina; LIN, lincomicina; CLI, clindamicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; MUP, mupirocina; FUS, ácido fusídico; LZD, linezolid; CIP, ciprofloxacina; ¹Resistencia intermedia.

^cNR, no realizado.

5. MECANISMOS DE RESISTENCIA INUSUALES EN CEPAS SARM CC398 Y OTRAS CEPAS DE *Staphylococcus* spp.

Se seleccionaron 21 cepas de *Staphylococcus* spp. tanto de origen animal como de origen humano, algunas de ellas SARM CC398, que presentaban el fenotipo poco frecuente de resistencia a lincomicina y sensibilidad a eritromicina. El objetivo fue identificar y caracterizar los mecanismos de resistencia responsables de dicho fenotipo. Las cepas seleccionadas habían sido aisladas en el desarrollo de esta tesis o fueron incorporadas al detectarse en otros centros de investigación. En la **Tabla 69** se indican todas las cepas estudiadas y su origen en función del gen de resistencia detectado. Como se observa en dicha tabla 7 cepas fueron SARM ST398.

Tabla 69.- Cepas resistentes a lincomicina y sensibles a eritromicina en función del gen de resistencia detectado.

Gen detectado	Cepa	Especie y RM ^a	MLST	Origen
<i>lnu(A)</i>	C1841	SARM	ST398	Cerdo (caso clínico 2)
	C4128 ^b	SARM	ST398	Cerdo
	C5425	SARM	ST125	Humano
	C2376	SCRM	-	Cerdo (caso clínico 4)
<i>lnu(B)</i>	C2828	SASM	ST9	Humano
	C2829	SASM	ST9	Humano
	C2944	SARM	ST398	Humano (estudio cepas SARM-TET ^R)
<i>vga(A)</i>	C2931	SARM	ST398	Humano (estudio cepas SARM-TET ^R)
	C2362	SARM	ST398	Humano (caso clínico 4)
	C2355	SARM	ST398	Humano (caso clínico 7)
	C4128 ^b	SARM	ST398	Cerdo
	C5250	SARM	ST398	Humano
	C3036	SERM	ST60	Gato
	C3937	SERM	ST83	Humano
	C2665 ^c	SESM	ST100	Humano
<i>vga(A)-variante</i>	C3897	SARM	ST8	Humano
	C3898	SARM	ST8	Humano
	C3899	SARM	ST8	Humano
	C3900	SARM	ST8	Humano
<i>cfr</i>	C2825	SERM	ST22	Humano
	C2826	SERM	ST22	Humano
	C2827	SERM	ST22	Humano

^aSCRM, *S. sciuri* resistente a meticilina; SERM, *S. epidermidis* resistente a meticilina; SESM, *S. epidermidis* sensible a meticilina.

^bLa cepa C4128 presentó el gen *lnu(A)* y el gen *vga(A)* y por ello aparece en ambos apartados.

^cLa cepa C2665 se aisló a partir de una muestra nasal del hijo del paciente del caso clínico 7.

5.1. Cepas portadoras del gen *lnu(A)*

Cuatro de las 21 cepas estudiadas presentaron el gen de resistencia *lnu(A)* y dos de ellas fueron SARM ST398. Las características de las cuatro cepas se detallan en la **Tabla 70**.

Tabla 70.- Características de las cuatro cepas de estafilococos portadoras del gen *lnu(A)*.

Cepa	Especie y RM	Fecha de aislamiento	Origen y muestra	CC/MLST/ <i>spa</i> / SCC <i>mecI agr</i>	Plásmido ^c
C1841	SARM	Enero 2009	Cerdo-nasal	CC398/ST398/t108/ V/ I	pLNU1 (2,3 kb)
C4128 ^a	SARM	Diciembre 2010	Cerdo-nasal	CC398/ST398/t011/V/I	pLNU1 (2,3 kb)
C5425	SARM	Agosto 2009	Humano ^b	CC5/ST125/t067/IV/II	pUR5425 (2,7 kb)
C2376	SCRM	Agosto 2009	Cerdo-nasal	-/-/III/-	pLNU1 (2,3 kb)

^aEsta cepa contenía también el gen *vga(A)*.

^bNo se conoce la muestra a partir de la cual se aisló esta cepa.

^cEl entorno genético detectado en las diferentes cepas se muestra en la **Figura 30**.

Se llevaron a cabo experimentos de transformación obteniendo transformantes de todas las cepas. Tanto los transformantes, como las cepas dadoras y la cepa receptora, fueron estudiados por dilución en agar para establecer el valor de CMI de clindamicina, lincomicina, virginiamicina, linezolid, tiamulina, eritromicina y cloranfenicol. Los resultados se muestran en la **Tabla 71**.

Tabla 71.- Valores de CMI de las 4 cepas portadoras del gen *lnu(A)*, de sus transformantes y de la cepa receptora RN4220.

Cepa	Genes de resistencia a lincosamidas	MIC ^a (mg/L)						
		CLI	LIN	VIR	LZ	TIA	ERI	CLO
C1841	<i>lnu(A)</i>	0,5	>128	0,5	1	2	0,25	4
Tf-C1841	<i>lnu(A)</i>	0,25	64	0,125	1	0,125	0,25	4
C4128	<i>lnu(A)+vga(A)</i>	8	>128	2	2	128	0,25	8
Tf-C4128	<i>lnu(A)</i>	0,25	64	0,125	1	0,125	0,25	4
C2376	<i>lnu(A)</i>	2	>128	2	1	>128	0,25	4
Tf-C2376	<i>lnu(A)</i>	0,25	64	0,125	1	0,125	0,25	4
C5425	<i>lnu(A)</i>	0,25	128	0,25	1	0,5	0,25	4
Tf-C5425	<i>lnu(A)</i>	0,25	64	0,125	1	0,125	0,25	4
RN4220 ^b	-	0,25	0,5	0,125	1	0,125	0,25	4

^aCLI, clindamicina; LIN, lincomicina; VIR, virginiamicina; LZ, linezolid; TIA, tiamulina; ERI, eritromicina; CLO, cloranfenicol.

^bCepa de *S. aureus* utilizada como receptora en los experimentos de transformación.

Los valores de CMI de clindamicina, tiamulina y virginiamicina de las cepas C4128 y C2376 fueron más elevados que los obtenidos en las cepas C1841 y C5425. En el caso de la cepa C4128 el valor a clindamicina fue mucho más elevado que el de la cepa C2376. Sin embargo, los transformantes de todas las cepas presentaron los mismos valores de CMI aumentándose sólo el valor de CMI de lincomicina.

Gracias a los experimentos de hibridación llevados a cabo, se detectó que el gen *lnu(A)* se encontraba en plásmidos de pequeño tamaño (de 2,3 a 2,7 kb aproximadamente según la cepa). Se decidió estudiar los entornos genéticos de *lnu(A)* de las cuatro cepas dadoras mediante PCR inversa. En las cepas C1841, C4128 y C2376 el gen se encontraba localizado en el plásmido pLNU1 descrito anteriormente en una cepa de *S. chromogenes* (AM184099.1). Este plásmido presentaba un tamaño de 2361 pb y un contenido en GC del 29%. Por otro lado, en la cepa restante (C5425), se identificó un plásmido nuevo (pUR5425 GenBank JQ861958.1) portador del gen *lnu(A)* de 2690 pb y con un contenido en GC del 31%. Este plásmido fue muy similar (92,8%) al plásmido pLNU4 ya descrito (AM184102.1). Las diferencias más relevantes entre pUR-5425 y pLNU4 fueron la presencia de cuatro cambios aminoacídicos en la proteína Rep (Glu16Lys, Val202Ile, Asp212Asn y Asn331Asp) y gran variedad de cambios en la región intergénica entre el gen *rep* y el origen de replicación de cadena sencilla (*ssoA*). Además, la proteína Lnu(A) codificada por el gen *lnu(A)* del plásmido pUR5425 fue idéntica a la proteína codificada por el gen del plásmido pLNU4. Sin embargo, la proteína del plásmido pLNU1 sí que mostró seis cambios aminoacídicos si la comparamos con la de los plásmidos pUR5425 y pLNU4. Las estructuras de los plásmidos pLNU1, pLNU4 y del plásmido nuevo pUR5425 se detallan en la **Figura 30**.

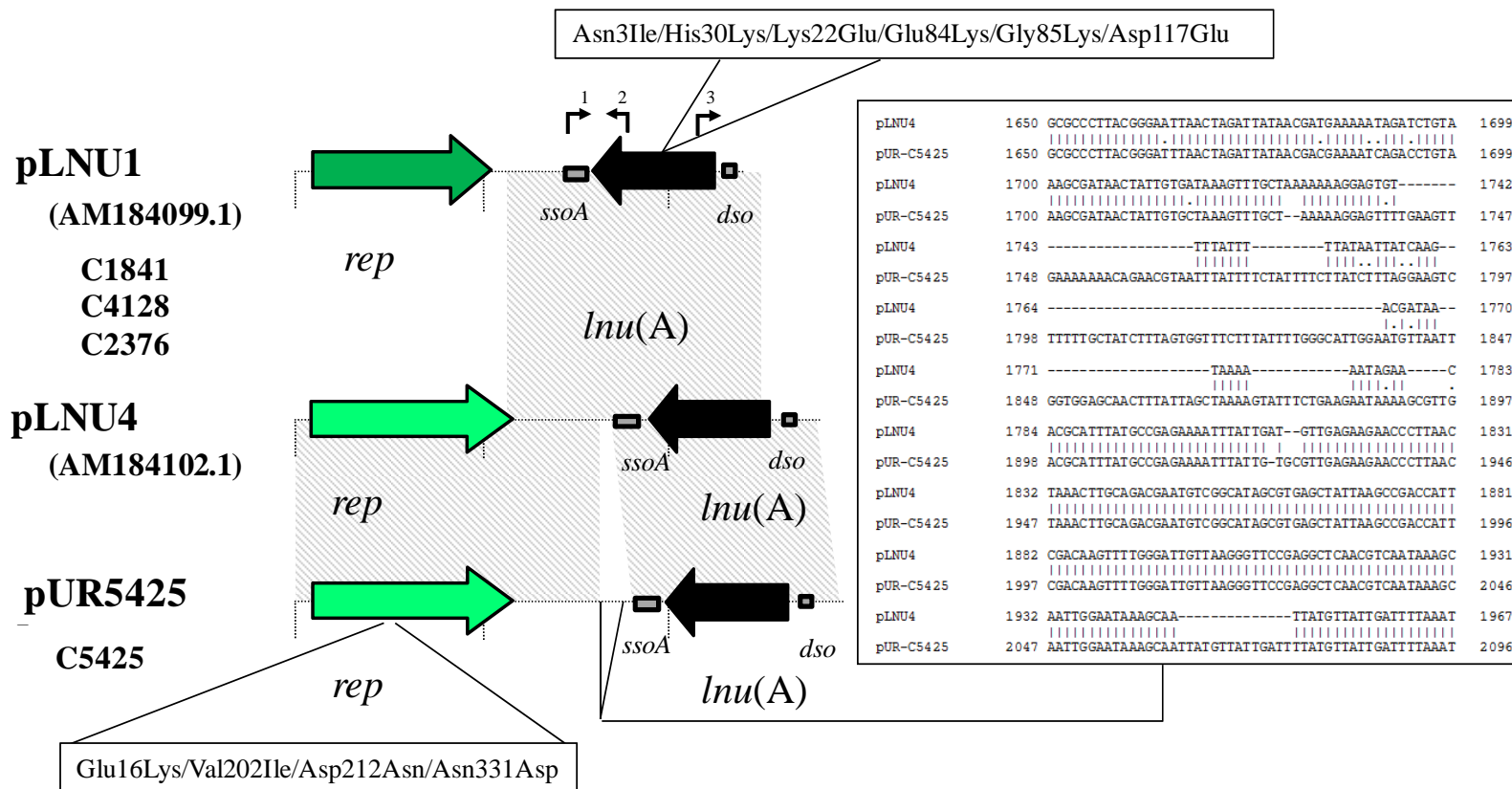


Figura 30. Estructura completa del plásmido pLNU1 detectado en las cepas C1841, C4128 y C2376, del nuevo plásmido pUR5425 detectado en la cepa C5425 y del plásmido pLNU4. Algunas de las diferencias entre el plásmido pLNU4 y el nuevo plásmido pUR5425 se muestran en recuadros. También se marcan los cambios entre la proteína Lnu(A) del plásmido pLNU1 y los otros dos plásmidos. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección. Dichos cebadores se detallan en las tablas 43 y 44 (páginas 106 y 107) con la siguiente nomenclatura, 1: *lnu(A)*-1, 2: *lnu(A)*inv-R, 3: *lnu(A)*inv-F. La distancia entre líneas punteadas verticales corresponde con una longitud de 1000 pb.

5.2. Cepas portadoras del gen *lnu(B)*

El gen *lnu(B)*, fue identificado en tres cepas aisladas a partir de lesiones cutáneas de tres pacientes no relacionados, una de ellas SARM ST398. Las características de estas tres cepas se detallan en la **Tabla 72**.

Tabla 72.- Características de las tres cepas de estafilococos portadoras del gen *lnu(B)*^a.

Cepa	Fecha de aislamiento	MLST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec</i> / <i>agr</i>	Fenotipo de resistencia ^b	Genotipo de resistencia	Localización
C2828	Diciembre 2009	ST9/t337	-/II	CLI-LIN-TIA-TET-STR-GEN-TOB-KAN-CIP ^c	<i>lnu(B)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>aac(6')</i> -Ie- <i>aph(2'')</i> -Ia, <i>ant(4')</i> -Ia	Cromosoma
C2829	Enero 2010	ST9/t337	-/II	CLI-LIN-TIA-TET-STR-GEN-TOB-KAN-CIP ^c	<i>lnu(B)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>aac(6')</i> -Ie- <i>aph(2'')</i> -Ia, <i>ant(4')</i> -Ia	Cromosoma
C2944	Enero 2009	ST398/t011	V/I	OXA-CLI-LIN-TIA-TET-STR-GEN-TOB-KAN-CIP ^b	<i>lnu(B)</i> , <i>mecA</i> , <i>tet(M)</i> , <i>aac(6')</i> -Ie- <i>aph(2'')</i> -Ia	Plásmido (250 kb)

^aEn naranja aparecen las cepas sensibles a meticilina y en azul la cepa resistente a meticilina.

^bCLI, clindamicina; LIN, lincomicina; TIA, tiamulina; TET, tetraciclina; STR, estreptomina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; CIP, ciprofloxacina.

^cSe detectaron los mismos cambios aminoacídicos en las tres cepas, Ser84Leu en GrlA y Ser80Phe en ParC.

Las dos cepas SARM pertenecieron al mismo ST y tipo *spa*, presentaron los mismos tipos de SCC*mec* y *agr* y similares características fenotípicas y genotípicas. Por PFGE presentaron dos patrones estrechamente relacionados (**Figura 31**).

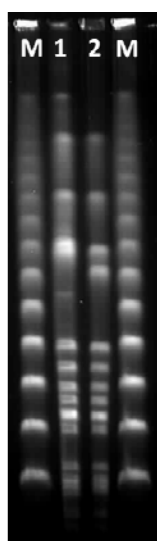


Figura 31. Patrones de PFGE de las cepas SARM del Hospital General Universitario de Elche. Línea 1, C2828; línea 2, C2829. M: marcador de peso molecular λ Ladder.

Las tres cepas mostraron los mismos valores de CMI de clindamicina, lincomicina, virginiamicina, linezolid, tiamulina, eritromicina y cloranfenicol, destacando la elevada CMI obtenida para lincomicina, clindamicina y tiamulina (**Tabla 73**).

Tabla 73.- Valores de CMI de las tres cepas portadoras del gen *lnu(B)*.

Cepa	Genes de resistencia a lincosamidas	MIC ^a (mg/L)						
		CLI	LIN	VIR	LZD	TIA	ERI	CLO
C2828	<i>lnu(B)</i>	8	128	2	1	>128	0,25	4
C2829	<i>lnu(B)</i>	8	128	2	1	>128	0,25	4
C2944	<i>lnu(B)</i>	8	128	2	1	>128	0,25	4

^aCLI, clindamicina; LIN, lincomicina; VIR, virginiamicina; LZD, linezolid; TIA, tiamulina; ERI, eritromicina; CLO, cloranfenicol.

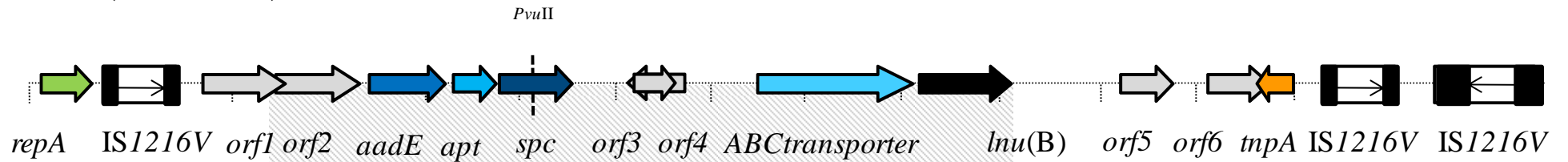
No se obtuvieron transformantes de ninguna de las cepas lo cual se explica porque en el caso de las dos cepas SASM el gen *lnu(B)* se encontraba en el cromosoma y en la cepa de SARM en un plásmido de gran tamaño (250 kb).

El entorno genético fue similar en las tres cepas. La estructura de ese entorno genético se detalla en la **Figura 32** y fue introducido en la base de datos del GenBank con el número JQ861959.1. Mediante la técnica de mapeo por PCR, y gracias al diseño de cebadores basándose en la estructura del plásmido de enterococos ya descrito pEF418 (AF408195.1), se detectaron los genes *aadE*, *apt*, *spc* y un gen codificante de un transportador ABC aguas arriba del gen *lnu(B)*. Posteriormente, se digirió el ADN de la cepa C2944 con la enzima *PvuII*, se ligó y se amplificó por PCR inversa. De esta forma, se identificó la presencia de la secuencia de inserción IS257. Se diseñaron cebadores para comprobar la presencia de la secuencia de inserción IS257 aguas abajo del gen *lnu(B)* lo cual fue confirmado por PCR y secuenciación.

Por último, por PCR, se comprobó que las otras dos cepas (C2828 y C2829) presentaban la misma estructura genética y que se formaban intermedios circulares del entorno genético completo. Para la amplificación de posibles intermedios circulares se utilizaron los cebadores 2 y 9 que se muestran en la **Figura 32**.

pEF418

(AF408195.1)



C2944

C2828

C2829

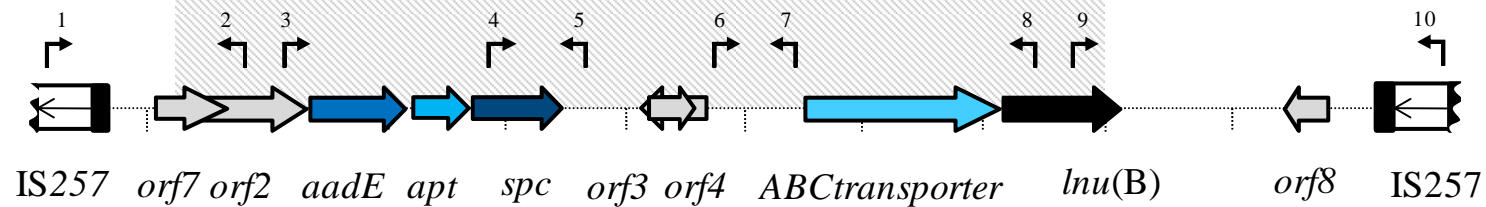


Figura 32. Estructura del nuevo entorno genético del gen *lnu(B)* detectado en las cepas C2944, C2828 y C2829 y la estructura del plásmido ya descrito pEF418. El sitio de reconocimiento de la enzima *PvuII* se muestra mediante una línea discontinua. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección. Dichos cebadores se detallan en la tabla 40 (página 104) con la siguiente nomenclatura, 1: C2944-tnp-F, 2: *spc*-like-inv-R, 3: pEF418-3-F, 4: pEF418-2-F, 5: pEF418-3-R, 6: pEF418-1-F, 7: pEF418-2-R, 8: pEF418-1-R, 9: pEF418-4-F, 10: IS257-R. La distancia entre líneas punteadas verticales corresponde con una longitud de 1000 pb.

5.3. Cepas portadoras del gen *vga(A)*

Se estudiaron ocho cepas portadoras del gen *vga(A)*, 5 de ellas SARM ST398, y las características de estas cepas se detallan en la **Tabla 74**.

Tabla 74.- Características de las ocho cepas de estafilococos portadoras del gen *vga(A)*.

Cepa	Especie y RM	Fecha de aislamiento	Origen y muestra	MLST/ <i>spa</i> / SCC <i>meclagr</i>	Genes de resistencia a lincosamidas	Plásmido ^b
C2931	SARM	Enero 2009	Humano Broncoaspirado	ST398/t011/V/I	<i>vga(A)</i>	pVGA (5,7 kb)
C2362	SARM	Agosto 2009	Humano Nasal	ST398/t108/V/I	<i>vga(A)</i>	pVGA (5,7 kb)
C2355	SARM	Julio 2009	Humano Líquido pleural	ST398/t011/V/I	<i>vga(A)</i>	pUR2355 (7,6 kb)
C4128	SARM	Diciembre 2010	Cerdo Nasal	ST398/t011/V/I	<i>vga(A)</i> + <i>lnu(A)</i>	pUR4128 (7,5 kb)
C5250	SARM	Marzo 2011	Humano Herida	ST398/t011/V/I	<i>vga(A)</i>	pUR2355 (7,6 kb)
C3036	SERM	Abril 2010	Gato Nasal	ST60/-/NT ^a /-	<i>vga(A)</i>	pUR3036 (7,2 kb)
C3937	SERM	Enero 2011	Humano Nasal	ST83/-/IV/-	<i>vga(A)</i>	pUR3937 (7,1 kb)
C2665	SESM	Diciembre 2009	Humano Nasal	ST100/-/-/-	<i>vga(A)</i>	pUR2355 (7,6 kb)

^aNT, no tipable.

^bEl entorno genético detectado en las diferentes cepas se muestra en las **Figuras 33 y 34**.

En la **Tabla 75** se muestran los valores de CMI hallados en las ocho cepas. Se obtuvieron cepas transformantes en todos los casos excepto en las cepas C4128, C3036 y C3937. Todas las cepas transformantes mostraron valores de CMI muy similares a los encontrados en las cepas dadoras.

Tabla 75.- Valores de CMI de las ocho cepas de estafilococos portadoras del gen *vga(A)*, de los transformantes obtenidos y de la cepa receptora (RN4220).

Cepa	Genes de resistencia a lincosamidas	Plásmidos	CMI (mg/L) ^a						
			CLI	LIN	VIR	LZD	TIA	ERI	CLO
C2931	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	2	128	0,25	4
Tf- C2931	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	1	>128	0,25	4
C2362	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	1	>128	0,25	4
Tf-C2362	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	1	>128	0,25	4
C2355	<i>vga(A)</i>	pUR2355 ^b	8	64	2	2	128	0,25	8
Tf-C2355	<i>vga(A)</i>	pUR2355	8	64	2	1	128	0,25	8
C2665	<i>vga(A)</i>	pUR2355	4	64	1	1	64	0,25	8
Tf- C2665	<i>vga(A)</i>	pUR2355	8	64	2	1	128	0,25	8
C5250	<i>vga(A)</i>	pUR2355	8	64	2	2	128	0,25	8
Tf- C5250	<i>vga(A)</i>	pUR2355	8	64	2	1	128	0,25	8
C4128	<i>vga(A) + lnu(A)</i>	pUR4128 ^b	8	>128	2	2	128	0,25	8
C3036	<i>vga(A)</i>	pUR3036 ^b	4	64	2	1	64	0,25	8
C3937	<i>vga(A)</i>	pUR3937 ^b	8	64	2	2	128	0,25	4
RN4220 ^c	-	-	0,25	0,5	0,125	2	0,125	0,25	4

^aCLI, clindamicina; LIN, lincomicina; VIR, virginiamicina; LZD, linezolid; TIA, tiamulina, ERI, eritromicina; CLO, cloranfenicol.

^bPlásmidos nuevos descritos en este estudio.

^cCepa de *S. aureus* utilizada como receptora en los experimentos de transformación.

Gracias a los experimentos de hibridación llevados a cabo se determinó que en todos los casos el gen *vga(A)* se encontraba en plásmidos de pequeño tamaño de 5 a 8 kb aproximadamente. En los casos en los que se obtuvieron transformantes, tanto en la cepa dadora como en el transformante, el tamaño de plásmido en el que hibridó la sonda fue el mismo.

Gracias a la técnica de mapeo por PCR se detectó que dos de las cepas SARM (C2362 y C2931) contenían el gen *vga(A)* en el plásmido pVGA (FJ207465.1) de 5,7 kb y con un contenido en GC del 34%. El resto de los plásmidos fueron identificados por PCR inversa y posterior secuenciación detectándose cuatro plásmidos nuevos pUR2355, pUR4128, pUR3936 y pUR3937 (GenBank JQ312422.1, JQ861960.1,

JQ312423.1 y JQ312424.1, respectivamente). Las estructuras de los plásmidos nuevos y del plásmido pVGA se detallan en las **Figuras 33 y 34**.

Uno de los plásmidos nuevos (pUR2355) presentó un tamaño de 7609 pb, un contenido en GC del 33% y contenía los genes *rlx* y *mobC* los cuales codifican proteínas de movilización de 321 y 127 aminoácidos cada una. Se identificaron también dos genes *rep* cuyas proteínas presentaban un tamaño de 154 y 288 aminoácidos. Si comparamos la proteína Vga(A) codificada por el gen contenido en este plásmido con el presente en el plásmido pVGA, se observan cuatro cambios aminoácídicos, Ser212Leu, Thr220Ala, Ser226Gly y Arg247Ser (**Figuras 33 y 35**).

Otro plásmido nuevo (pUR4128) fue muy similar al anterior y su tamaño fue de 7567 pb con un contenido en GC del 32%. La diferencia entre el plásmido pUR4128 y el plásmido pUR2355 radicó en el tamaño del gen *rlx*. En el plásmido pUR4128 la proteína Relaxasa contenía 307 aminoácidos (14 aminoácidos menos que la proteína del plásmido pUR2355). En el plásmido pUR4128 la proteína Vga(A) fue similar a la codificada por el plásmido pVGA (**Figura 34 y 35**).

En cuanto a los otros dos plásmidos nuevos (pUR3036 y pUR3937) fueron muy parecidos entre ellos y muy similares al plásmido pSE-12228-06 de *S. epidermidis* (AE015935.1). El plásmido pUR3036 presentó un tamaño de 7209 pb, un contenido en GC del 32% y el análisis de su secuencia reveló la presencia de varias proteínas de Movilización de 269, 236, 66 y 127 aminoácidos y una proteína Rep de 274 aminoácidos. El otro plásmido denominado pUR3937 tuvo un tamaño de 7081 pb y un contenido en GC del 32%. Este plásmido se diferenció del plásmido pUR3036 en un cambio aminoácídico en una de las proteínas de Movilización (Ser124Asn) y en la falta de un fragmento de 127 nucleótidos en la región intergénica entre los genes *vga(A)* y *mobC*. Además, aunque la proteína Vga(A) del plásmido pUR3036 presentó tres cambios aminoácídicos (Leu4Met, Ile36Val, Ser41Asn) con respecto a la del plásmido pVGA, la del plásmido pUR3937 fue similar a la del pVGA.

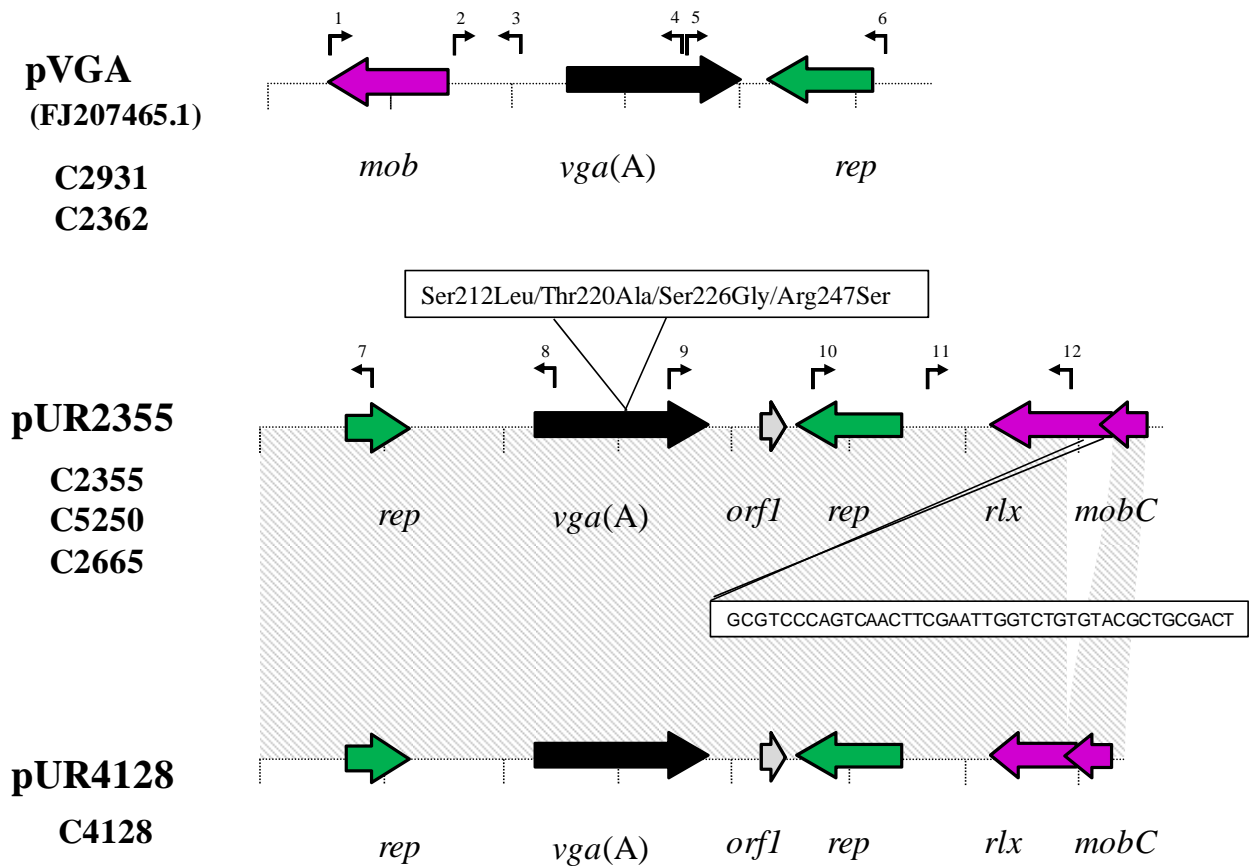


Figura 33. Estructura completa del plásmido pVGA detectado en las cepas C2931 y C2362 y de los plásmidos pUR2355 y pUR4128 descrito en este estudio e identificado en las cepas C2355, C5250, C2665 y C4128. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección. Dichos cebadores se detallan en las tablas 41 y 44 (páginas 105, 106 y 107) con la siguiente nomenclatura, 1: pCPS32-b-f, 2: pCPS32-a-f, 3: pCPS32-b-r, 4: pCPS32-a-r, 5: pCPS32-c-f, 6: pCPS32-c-r, 7: *vga(A)*-1, 8: *vga(A)*inv-F, 9: *vga(A)*inv-R, 10: *vga(A)*-2, 11: *vga(A)*-3, 12: *vga(A)*-4. Se marcan en recuadros las diferencias entre los dos plásmidos nuevos. La distancia entre líneas punteadas verticales corresponde con una longitud de 1000 pb.

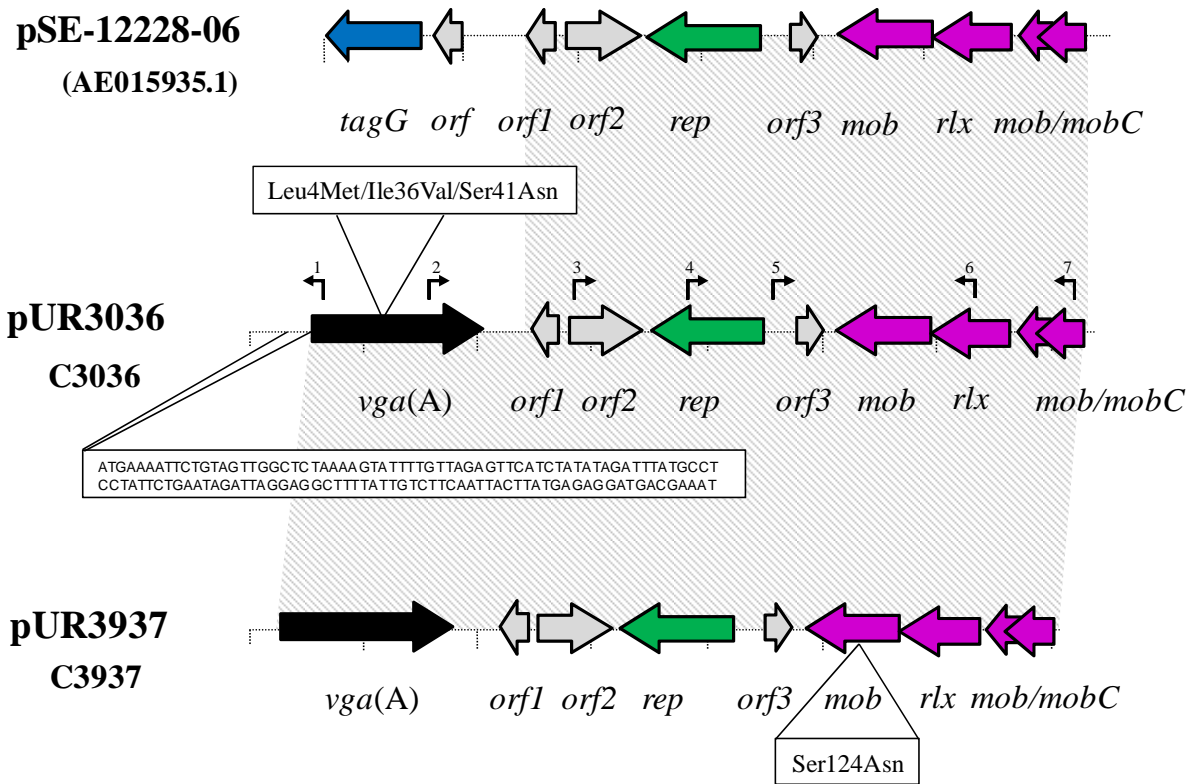


Figura 34. Estructura completa del plásmido pSE-12228-06 y de los nuevos plásmidos pUR3036 y pUR3937 descritos en este estudio e identificados en las cepas C3036 y C3937. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección. Dichos cebadores se detallan en las tabla 41 y 44 (páginas 104-107) con la siguiente nomenclatura, 1: *vga(A)inv-F*, 2: *vga(A)inv-R*, 3: *vga(A)-5*, 4: *vga(A)-6*, 5: *vga(A)-7*, 6: *vga(A)-8*, 7: *vga(A)-9*. Se marcan en recuadros las diferencias entre los dos plásmidos nuevos. La distancia entre líneas punteadas verticales corresponde con una longitud de 1000 pb.

El alineamiento de las distintas secuencias de las proteínas Vga(A) de los diferentes plásmidos se muestra en la **Figura 35**.

pUR3036	MKII	LEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGL	V	GKNG	SGKTTLLHILYKKTIVPEEGI	60
pUR3937	MKI	LEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGL	V	GKNG	SGKTTLLHILYKKTIVPEEGI	60
pUR4128	MKI	LEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGL	V	GKNG	SGKTTLLHILYKKTIVPEEGI	60
pCPS32	MKI	LEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGL	V	GKNG	SGKTTLLHILYKKTIVPEEGI	60
pVGA	MKI	LEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGL	V	GKNG	SGKTTLLHILYKKTIVPEEGI	60
pUR2355	MKI	LEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGL	V	GKNG	SGKTTLLHILYKKTIVPEEGI	60
:**:****.*****						
pUR3036	VKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLLADEPTT	NLDNNYIEKLEQ	120			
pUR3937	VKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLLADEPTT	NLDNNYIEKLEQ	120			
pUR4128	VKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLLADEPTT	NLDNNYIEKLEQ	120			
pCPS32	VKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLLADEPTT	NLDNNYIEKLEQ	120			
pVGA	VKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLLADEPTT	NLDNNYIEKLEQ	120			
pUR2355	VKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLLADEPTT	NLDNNYIEKLEQ	120			

pUR3036	DLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEI	DEGRITEYKGNYSNYVEQKELERHREELEYE	180			
pUR3937	DLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEI	DEGRITEYKGNYSNYVEQKELERHREELEYE	180			
pUR4128	DLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEI	DEGRITEYKGNYSNYVEQKELERHREELEYE	180			
pCPS32	DLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEI	DEGRITEYKGNYSNYVEQKELERHREELEYE	180			
pVGA	DLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEI	DEGRITEYKGNYSNYVEQKELERHREELEYE	180			
pUR2355	DLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEI	DEGRITEYKGNYSNYVEQKELERHREELEYE	180			

pUR3036	KYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLS	S	SEGKIKG	IKPYFAS	KQKQLRKTIVKSLET	240
pUR3937	KYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLS	S	SEGKIKG	IKPYFAS	KQKQLRKTIVKSLET	240
pUR4128	KYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLS	S	SEGKIKG	IKPYFAS	KQKQLRKTIVKSLET	240
pCPS32	KYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLS	S	SEGKIKG	IKPYFAS	KQKQLRKTIVKSLET	240
pVGA	KYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLS	S	SEGKIKG	IKPYFAS	KQKQLRKTIVKSLET	240
pUR2355	KYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLS	L	SEGKIKG	AKPYFAS	KQKQLRKTIVKSLET	240
*****:****.*****						
pUR3036	RLEKLE	S	VEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGEDVSGTIEGRVLWKA	SFSIRGGDK	300	
pUR3937	RLEKLE	S	VEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGEDVSGTIEGRVLWKA	SFSIRGGDK	300	
pUR4128	RLEKLE	S	VEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGEDVSGTIEGRVLWKA	SFSIRGGDK	300	
pCPS32	RLEKLE	S	VEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGEDVSGTIEGRVLWKA	SFSIRGGDK	300	
pVGA	RLEKLE	S	VEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGEDVSGTIEGRVLWKA	SFSIRGGDK	300	
pUR2355	RLEKLE	S	VEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGEDVSGTIEGRVLWKA	SFSIRGGDK	300	

Figura 35. Alineamiento de las secuencias proteicas de Vga(A) codificadas por los genes *vga(A)* de los plásmidos pVGA, pCPS32, pUR2355, pUR4128, pUR3036 y pUR3937. Los cambios aminoacídicos aparecen marcados.

5.4. Cepas portadoras del gen *vga(A)*-variante

Se detectaron cuatro cepas SARM (C3897, C3898, C3899, C3900) de una misma paciente que portaban una variante del gen *vga(A)*. Estas cepas fueron detectadas en el Hospital Royo Villanova de Zaragoza y se aislaron a partir de la muestra nasal de la paciente, de una lesión cutánea en la mama, de un frotis axilar y de una muestra de broncoaspirado. Todas ellas presentaron las mismas características fenotípicas y genotípicas siendo resistentes, además de a meticilina, a mupirocina, lincosamidas, pleuromutilinas y quinolonas. Todas ellas contenían el gen *mupA* y presentaron los cambios aminoacídicos Ser80Phe en GrlA y Ser84Leu en GyrA. Estas cepas pertenecieron a la ST8, su tipo de *spa* fue t008 y su SCC*mec* tipo IVa. Se decidió

analizarlas por PFGE para ver si se trataba del mismo clon y todas ellas presentaron el mismo patrón de PFGE por lo que se seleccionó una cepa (C3898) para posteriores estudios.

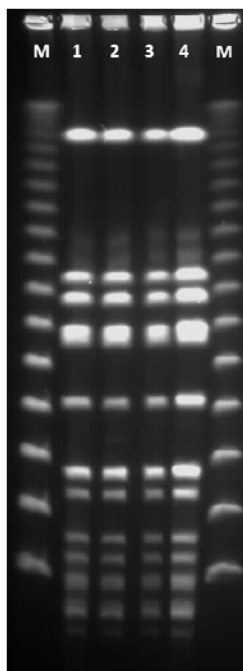


Figura 36. Patrones de PFGE de las cepas SARM obtenidas a partir de la paciente. Línea 1, C3897; línea 2, C3898; línea 3, C3899; línea 4, C3900. M: marcador de peso molecular λ Ladder.

Los valores de CMI obtenidos fueron los siguientes: clindamicina 1 mg/L, lincomicina 16 mg/L, virginiamicina 2 mg/L, linezolid 1 mg/L, tiamulina 16 mg/L, eritromicina 0,25 mg/L y cloranfenicol 8 mg/L. Por tanto, los valores de CMI obtenidos para la clindamicina, lincomicina y tiamulina en esta cepa fueron menores que los detectados en las cepas *vga(A)* positivas.

No se obtuvieron transformantes de esta cepa y al estudiar la localización del gen *vga(A)*-variante se observaron múltiples copias de dicho gen en el cromosoma. Se analizó su entorno genético por mapeo por PCR, y se vio que era muy similar al del transposón Tn5406, diferenciándose de éste en dos cambios aminoacídicos (Phe81Ser y Glu96Lys) en la proteína TnpC-like. Esta nueva estructura fue incluida en el GenBank con el número JQ319423.1. Además, se observó la presencia de intermedios circulares por PCR mediante la utilización de los cebadores 5 y 9 que se muestran en la **Figura 37**. Esto sugirió que este transposón era activo funcionalmente.

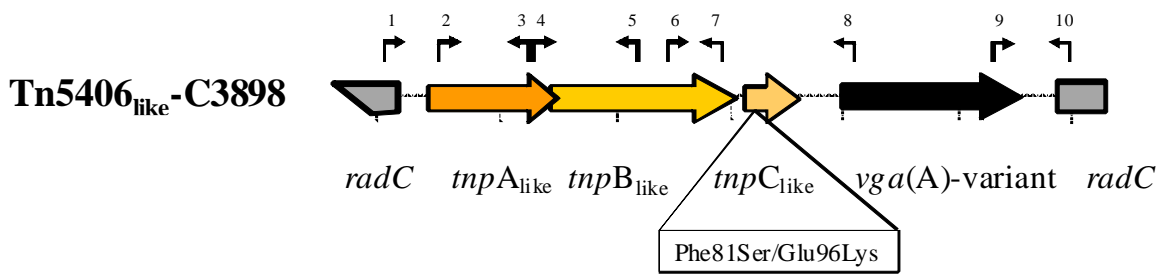


Figura 37. Estructura del Tn5406 detectado en la cepa C3898. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección. Dichos cebadores se detallan en la tabla 41 (página 104 y 105) con la siguiente nomenclatura, 1: Tn5406-H-1, 2: Tn5406-H-5, 3: Tn5406-4-r, 4: Tn5409-3-f, 5: Tn5406-H-6, 6: Tn54096-2-f, 7: Tn5409-2-r, 8: *vga(A)inv-F*, 9: *vga(A)inv-R*, 10: att554-r-new. Se marcan en un recuadro los dos cambios aminoacídicos que lo diferencian de la secuencia AF186237.2. La distancia entre líneas punteadas verticales corresponde con una longitud de 1000 pb.

5.5. Cepas portadoras del gen *cfr*

Se estudiaron tres cepas SERM aisladas a partir de un caso clínico muy grave detectado en el Hospital General Universitario de Elche. Las tres cepas SERM (C2825, C2826, C2827) fueron detectadas a partir de muestras de líquido cefaloraquídeo, drenaje pleural y catéter vascular. Dichas cepas presentaron el fenotipo disociado de resistencia a lincomicina y sensibilidad a eritromicina presentando también resistencia a linezolid, clindamicina, cloranfenicol, tiamulina, virginamicina, aminoglucósidos, quinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol y ácido fusídico. Las tres cepas presentaron el mismo patrón de PFGE, pertenecieron a la secuencia tipo ST22 y su tipo de SCC mec fue III. Además, contenían los genes *cfr*, *fexA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* y *df r S1*, mostraron los cambios aminoacídicos Ser80Phe y Asp84Asn en GrlA y Ser84Phe en GyrA. Las proteínas L3 y L4 presentaron los cambios Leu101Val y Ala58Thr y la inserción 135GlnGlyArgGlyProMet136 en L3 y Asn64Lys y Asn158Ser y la inserción 71Gly72 en L4. La secuencia de la región V del gen ARNr 23S mostró la mutación C2561T según la numeración de *Staphylococcus* (C2534T según la numeración de *Escherichia coli*). Se observó la existencia de dos picos en el cromatograma lo que indica que no todas las copias del gen se encontraban alteradas (**Figura 38**). No se detectaron cambios en la proteína L22, ni mutaciones en el gen *fusA*.

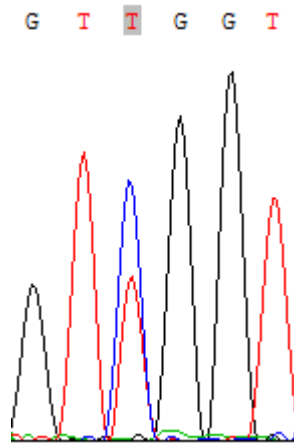


Figura 38. Cromatograma en el que se observa doble pico en la posición 2561. La mutación aparece marcada.

Se estudió por hibridación la localización de los genes *cfr* y *fexA* en la cepa aislada del líquido cefaloraquídeo (C2826) y se observó que ambos genes se encontraban localizados en un plásmido de 45 kb el cual pudo ser transferido por conjugación. La frecuencia de conjugación detectada fue muy baja $1,2 \times 10^{-8}$ transconjugantes/receptoras. El transconjugante y el dador presentaron el mismo entorno genético que correspondió con el plásmido pSCFS7 (FR675942.1). La estructura de este plásmido secuenciada se muestra en la **Figura 39**. Además, se hibridó el transconjugante y se observó que ambos genes se encontraban en esta cepa también en un plásmido de 45kb. Los valores de CMI obtenidos en las tres cepas aisladas a partir del paciente, en la cepa tranconjugante y en la cepa receptora se muestran en la **Tabla 76**.

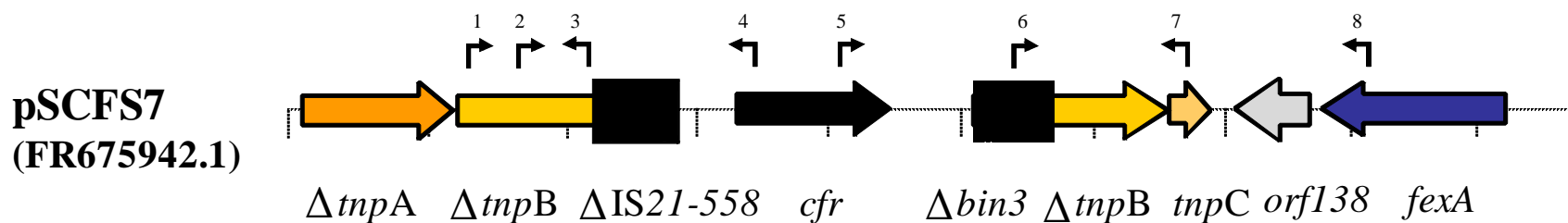


Figura 39. Estructura del plásmido pSCFS7. Los cebadores empleados en la amplificación y secuenciación están numerados y señalados con flechas en función de su dirección. Dichos cebadores se detallan en la tabla 42 (página 105) con la siguiente nomenclatura, 1: *tnpB*-2-F, 2: pSCFS7-1-F, 3: *tnpB*-2-R, 4: *cfr*inv-F, 5: *cfr*inv-R, 6: *cfr*-ent-1-F, 7: *cfr*-ent-1-R, 8: *fexA*inv-R. La distancia entre líneas punteadas verticales corresponde con una longitud de 1000 pb.

Tabla 76.- Valores de CMI y mecanismos de resistencia detectados en las tres cepas SERM, en la cepa receptora (ATCC 29213) y en el transconjugante.

Cepa	CMI (mg/L) ^a									Genes de resistencia	Mutación (ARNr 23S)	Cambios aminoacídicos ^b	
	LZD	CLO	CLI	LIN	ERI	TIA	VIR	TET	TMP			L3	L4
C2826 ^c	64	>256	>256	>256	1	>128	32	0,125	64	<i>cfr, fexA,</i> <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-</i> <i>Ia, dfrS1</i>	C2534T	A58T, L101V, I:135QGRGPM136	N64K, N158S, I:71G72
ATCC 29213	2	4	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	0,25	2	-	-	-	-
TC-2826 ^d	16	128	>256	>256	0,25	>128	32	0,25	2	<i>cfr, fexA</i>	-	-	-

^aLZD, linezolid; CLO, cloranfenicol; CLI, clindamicina; LIN, lincomicina; ERI, eritromicina; TIA, tiamulina; VIR, virginiamicina; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim.

^bI, inserción.

^cLos valores de CMI de las cepas C2825 y C2827 fueron similares a los de la cepa C2826.

^dCepa transconjugante de la cepa C2826.

Por otro lado, la hibridación de la membrana obtenida a partir del gel de *I-CeuI*-PFGE con las sondas de *cfr*, *fexA* y 16S ARNr reveló que los genes *cfr* y *fexA* también se encontraban localizados en el cromosoma de la cepa C2826, pero no en la cepa transconjugante. Las imágenes de las hibridaciones de este estudio se muestran en la **Figura 40**.

Las tres cepas fueron negativas para la PCR de la leucocidina de Pantone-Valentine. Sin embargo, sí que fueron positivas las PCRs para los genes relacionados con la formación de biofilm *icaA*, *icaB* e *icaC*.

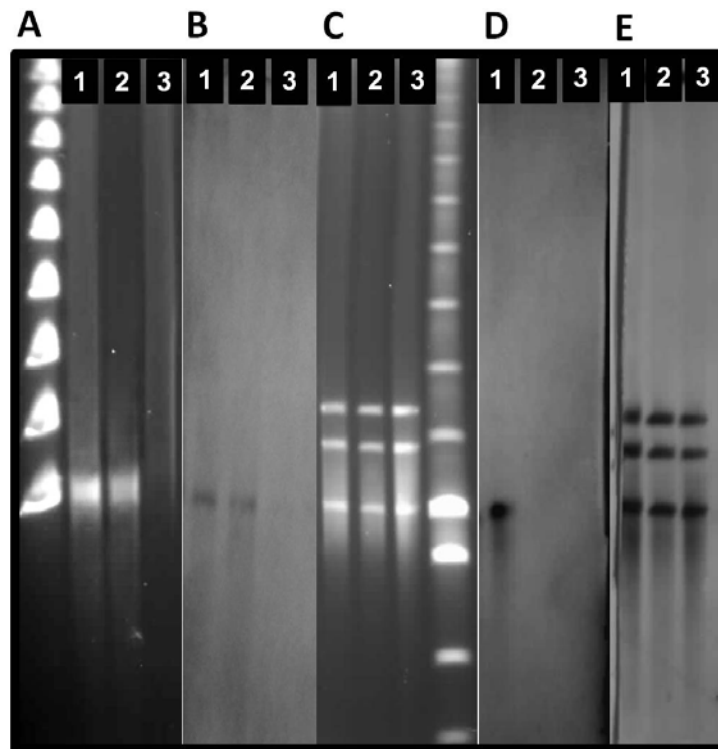


Figura 40. Imágenes de las hibridaciones realizadas para establecer la localización del gen *cfr*. Los números 1, 2 y 3 corresponden con las siguientes cepas: 1) cepa C2826, 2) transconjugante de la cepa C2826, 3) cepa receptora de *S. aureus* ATCC 29213. A) S1-PFGE; B) Hibridación del gel S1-PFGE; C) *I-CeuI*-PFGE; D) Hibridación del gel *I-CeuI*-PFGE con la sonda de *cfr*; E) Hibridación del gel *I-CeuI*-PFGE con la sonda 16S ARNr.

6. TIPADO Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS EN CEPAS DE

S. aureus

A continuación fue nuestro objetivo profundizar en el estudio de plásmidos en *S. aureus*, tanto en cepas CC398 como en cepas de otras líneas clonales y aisladas a partir de diferentes orígenes. Para ello, se realizó una estancia de tres meses en el laboratorio del Dr. Aarestrup. Allí se aprendió el uso del sistema de clasificación de plásmidos anteriormente diseñado para Gram positivos por el grupo (Jensen et al., 2010) y se amplió para optimizarlo con el fin de utilizarlo en cepas de *S. aureus*.

Optimización del sistema de clasificación

Para la optimización del sistema de clasificación, se analizaron en primer lugar todas las secuencias de plásmidos de *S. aureus* presentes hasta la fecha en la base de datos del GenBank. Se estudiaron y compararon las regiones *rep* de los mismos y se determinó cuales de estas regiones, eran idénticas entre sí y/o estaban ya incluidas en el estudio anterior. Para ello se utilizaron diferentes páginas web como <http://www.ebi.ac.uk> o <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. En aquellos casos en que las regiones fueron idénticas, se eligió únicamente una de ellas para incluirla en el sistema. De esta forma, a partir de 187 secuencias de ADN que incluían 112 secuencias de *S. aureus* (81 no consideradas en el anterior estudio y 31 ya consideradas), 9 de otras especies del género *Staphylococcus*, 41 de *Enterococcus* spp., 6 de *Streptococcus* spp., y 11 de *Bacillus* spp., se estableció un sistema que nos permitiese clasificar nuestras cepas por PCR. En la **Tabla 77** se muestran las 112 secuencias de plásmidos de *S. aureus* consideradas en este estudio.

Posteriormente se utilizó el programa BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) y el análisis Neighbor-Joining para la realización de árboles filogenéticos tanto de la secuencia de nucleótidos, como de las proteínas. Mediante el estudio visual de los mismos se eligió un punto de corte del 75% para determinar las familias *rep*. Según este criterio se definieron 8 familias *rep* y 29 secuencias únicas (SUs) según las secuencias de ADN y 10 familias *rep* y 33 SUs según las secuencias de proteínas. Comparando ambos resultados se describieron un total de 15 familias *rep* (seis diseñadas en este estudio y 9 que ya aparecían en el estudio anterior) y 10 SUs. Posteriormente, se diseñaron cebadores para las nuevas familias *rep*, para las SUs y para la familia *rep*₅. Estos cebadores se muestran en la **Tabla 26** de la sección de material y métodos “Tipado de plásmidos” (página 77). Conviene puntualizar que se diseñaron nuevos cebadores para la familia *rep*₅ con el fin de poder amplificar nuevas secuencias

rep de *S. aureus* pertenecientes a esta familia que con los anteriores cebadores no se podían identificar.

Tabla 77.- Las 112 secuencias de genes *rep* de *S. aureus* con el nombre del gen/ORFs, nombre del plásmido y tamaño, número de acceso del GenBank, posición y tamaño y número de la familia *rep* a la cual pertenece.

Gen	Plásmido (kb)	Nº GenBank	Posición	Tamaño del gen <i>rep</i> (pb)	Familia <i>rep</i> ^a
repE	pIP680 (11,3)	AF117258.1	1-456	456	1
CDS2	pSAS (20,6)	BX571858	2527-3387	861	5
repB	pWBG752 (24,7)	GQ900394	5046-5906	861	5
rep	SAP047A (29)	GQ900405.1	960-1820	861	5
rep	pMW2 (20,7)	NC_005011	17577-18437	861	5
rep	pN315 (24,7)	AP003139	232-1215	984	5
rep	pRJ6 (7,9)	AF241888.2	6396-7325	930	5
rep	pRJ9 (10,4)	AF447813.1	2808-3665	858	5
Rep	pJE1 (50)	AF051916.1	798-1433	636	5
repC	Cassette	AB037671	30750-29806	945	7
repC	pSTE2 (6,9)	AJ888003	2599-1655	942	7
ORF	pT181 (4,4)	NC_001393	4289-4439, 1-794	942	7
ORF	pKH1 (24,8)	SAU38656	3769-4338	570	7
rep	pUSA02 (4,4)	NC_007791.1	3369-4313	945	7
rep	J3358 (6)	NC_001763.1	826-1770	945	7
repC	pKH16 (4,4)	NC_010262.1	3657-4442, 1-159	945	7
repC	pKH17 (4,4)	NC_010284.1	3656-4441, 1-159	945	7
repD	pTZ4 (4,6)	NC_010111.1	1213-2133	921	7
rep	SAP060B (4,5)	GQ900417.1	627-1571	945	7
rep	pSBK203 (3,8)	U35036.1	88-1032	945	7
repC	pS0385-1 (5,2)	AM990993.1	819-1568	750	7
rep	SAP094A (4,4)	GQ900443.1	4297-4439, 1-802	945	7
repD	pC221 (4,6)	X02529.1	1202-2137	936	7
rep	pUB112 (4)	M21929.1	189-1130	942	7
rep	pKH7 (4,1)	U38429.1	87-1019	933	7
repC	pKH6 (4,4)	U38428.1	3654-4439, 1-159	945	7
repE	pS194 (4,4)	X06627.1	3371-4315	945	7
rep	pS0385-2 (4,4)	AM990994.1	3626-4381, 1-177	933	7
rep	MSSA476	BX571857.1	138752-139572	821	7
CDS3	pUSA02 (4,4)	CP000257	3369-4313	945	7
repJ	pC223 (4,6)	NC_005243.1	4528-4608, 1-864	945	7b
rep	pVGA (5,7)	NC_011605.1	794-1732	939	7b
repA	SAP089A (4,6)	GQ900440.1	2642-1763	880	7b
repL	pDLK1 (2,4)	GU562624.1	28-504	477	10
rep	SAP093B (1,3)	GQ900442.1	89-565	477	10
ORF	pSN2 (1,3)	NC_001392	588-1064	477	10
repL	pWBG738 (2,5)	DQ088624.1	1-477	477	10

Tabla 77.- Continuación.

Gen	Plásmido (kb)	Nº GenBank	Posición	Tamaño del gen <i>rep</i> (pb)	Familia <i>rep</i> ^a
rep	pSK6 (1,6)	U96610.1	770-1234	465	10b
rep	SAP104B (1,6)	GQ900451.2	631-1095	465	10b
rep	pSK77 (27,7)	GQ900494.1	26776-27240	465	10b
rep	pSK3 (1,7)	U96609.1	876-1340	465	10b
rep	pSK17 (36,4)	GQ900513.1	9392-9856	465	10b
orf154	pOX2000 (1,6)	X55798.1	587-1051	465	10b
rep	pC194 (2,9)	NC_002013	117-812	696	13
rep	pKH13 (2,9)	NC_010426.1	341-1186	846	13
rep	pMC524/MBMc (2,9)	AJ312056.2	2141-2818	678	13
rep	pSK89 (2,4)	M37889	1149-226	924	13
rep	pWBG1773 (2,9)	EF537646	736-1659	924	13
repA	pUSA03 (37,1)	NC_007792.1	101-1060	960	15
repA	pLW043 (57,9)	AE017171	6349-7524	1176	15
rep	pSK41 (46,4)	AF051917	13205-14164	960	15
rep	pSAS (20,7)	NC_005951.1	4678-5421	744	16
CDS6	pSJH101 (30,4)	CP000737	4569-5552	984	16
CDS21	pSJH901 (30,4)	CP000704	20787-21530	744	16
rep	pSaa6159 (20,7)	CP002115.1	19682-20425	744	16
desconocido	SAP056A (27,1)	GQ900478.1	22022-21279	744	16
rep	SAP052A (32,4)	GQ900412.1	23379-22636	744	16
desconocido	pWBG759 (28,4)	GQ900401.1	16047-15304	744	16
desconocido	SAP019A (27,4)	GQ900385.1	15489-16232	744	16
desconocido	SAP071A (26,9)	GQ900485.1	12225-11482	744	16
ORF1	pTZ2162 (35,4)	AB304512.1	798-55	744	16
rep	pBORa53 (17,3)	AY917098.1	11368-12111	744	16
repA	pUB101 (21,8)	NC_005127.1	3335-4519	1185	19
rep	pWBG747 (33,7)	GQ900399.1	4085-3111	974	19
CDS20	pSJH901 (30,4)	CP000704	20361-19378	984	19
rep	pSA1379 (22,8)	AB255366.1	984-1	984	19
ORF34	EDINA (35)	AP003089.1	21196-22161	966	19
repA	SAP019A (27,4)	GQ900385.1	17541-16576	966	19
repA	pWBG759 (28,4)	GQ900401.1	13995-14622	628	19
repA	SAP071A (26,9)	GQ900485.1	10081-11055	975	19
rep	pWBG746 (33,7)	GQ900390.1	18009-18992	984	19
ORF1	EDINA (35)	AP003089	79-954	876	20
repA	pWBG753 (30)	GQ900395.1	590-1525	876	20
rep	pTW20_1 (29,6)	FN433597.1	11799-10810	990	20
repA	SAP102A (36,1)	GQ900496.1	28902-29846	945	20
repA	pSK23 (42)	GQ900491.1	6257-5750	508	20
repA	SAP059A (26,2)	GQ900480.1	14207-13700	508	20
repA	SAP074A (27,3)	GQ900426.1	25297-26241	945	20
repA	SAP063A (26)	GQ900418.1	15582-14638	945	20

Tabla 77.- Continuación.

Gen	Plásmido (kb)	Nº GenBank	Posición	Tamaño del gen <i>rep</i> (pb)	Familia <i>rep</i> ^a
repA	SAP055A (20,5)	GQ900414.1	17601-18108	508	20
rep	SAP057A (39,3)	NC_013334.1	2153-2674	522	20
repA	VRSAp (25,1)	AP003367	315-1250	936	20
rep	pWBG754 (2,2)	GQ900396.1	1804-2241, 1-561	999	21
rep	pNVH01 (2,7)	AJ512814.1	100-1104	1005	21
rep	pS0385-3 (3,2)	AM990995.1	775-1824	1050	21
repRC	pSK41 (46,4)	AF051917.1	15017-15907, 17520-17578	949	21
repRC	pGO1 (54)	FM207042.1	14981-15907	927	21
rep	pBMSa1 (2,8)	AY541446.1	939-1943	1005	21
rep	pWBG760	GQ900473.1	2801-3796	996	21
rep	SAP071A	GQ900485.1	5790-6506	717	21
rep	pKH12 (3)	EU168704.2	146-1141	996	21
rep	pKH14 (3,1)	EU164802.1	1846-2841	996	21
rep	pSA1308 (2,8)	AB254848.1	1-996	996	21
rep	pKH3 (3)	AF151117.1	146-1141	996	21
rep	SAP101A (32,2)	GQ900495.1	1089-1805	717	21
rep	pKH21 (2,5)	EU350088.1	2346-2531, 1-819	1005	21
repB	pUB110 (4,5)	X03408.1	514-1221	708	22
repU	pKKS825 (14,4)	FN377602.2	3428-4609	1182	22
rep	pPR9 (41,7)	GU237136.1	23537-24562	1026	23
rep	pV030-8 (39)	EU366902.1	100-1125	1026	23
rep	pWBG745 (38,2)	GQ900389.1	33459-34448	990	24
rep	pWBG749 (38,1)	GQ900391.1	4946-5929	984	24
repF	pE194 (3,7)	M17811.1	495-1094	600	Única
rep	pKKS825 (14,4)	FN377602.2	11218-12033	816	Única
rep	pKKS825 (14,4)	FN377602.2	1518-2879	1362	Única
rep2	pDLK3 (1,4)	GU562626.1	273-857	585	Única
rep	pAVX (17,3)	CP001784.1	10018-11301	1284	Única
rep	pWBG764 (2,4)	GQ900468.1	353-1318	966	Única
rep	SAP015B	GQ900502.1	672-1310	639	Única
repA	SAP099B (16,4)	GQ900449.1	11943-12878	936	Única
CDS20	pETB (38,2)	NC_003265	12002-13576	1575	Única
rep	pSK1 (28,2)	GU565967.1	1307-2227	921	Única

^aLas nuevas familias *rep* y las nuevas secuencias únicas aparecen marcadas en negrita.

Diversidad de plásmidos en 92 cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes

Una vez establecido el sistema de clasificación se seleccionaron 92 cepas de *S. aureus* (43 de la colección de la Universidad de La Rioja y 49 de la colección del Instituto Nacional de Alimentos de Dinamarca). Las cepas de la Universidad de La Rioja fueron caracterizadas en otros apartados de este trabajo y provenían de muestras clínicas humanas, de origen animal y alimentarias. Se seleccionaron cepas SARM de diferentes complejos clonales (CC1, CC5, CC8, CC22, CC30, CC228, CC247 y CC398) con el objetivo de establecer si había algún tipo de relación entre la variante genética y el contenido plasmídico. Las cepas de Dinamarca, todas ellas de origen animal, pertenecieron a los complejos CC9, CC30 y CC398. En este caso se seleccionaron cepas tanto sensibles a meticilina como resistentes, para establecer si existía algún tipo de asociación entre la resistencia a meticilina, los CCs y el contenido plasmídico. El tipado molecular de estas cepas ya había sido llevado a cabo y para ser incluidas en este estudio, se analizó su sensibilidad a antibióticos utilizando placas Sensititre^R DKVP.

Mediante PCR se estudiaron las 92 cepas utilizándose los cebadores descritos en estudios previos y en este trabajo, y se secuenciaron un total de 51 amplicones para corroborar que los cebadores habían sido correctamente diseñados. Los resultados obtenidos en las 92 cepas SARM se resumen en la **Tabla 78**.

Entre las 92 cepas se detectaron las familias *rep* 2, 5, 6, 7, 7b, 9, 10, 10b, 13, 15, 16, 20, 21 y 22 y las SUs pE194 y pKKS825. En una misma cepa se llegó a identificar un máximo de 5 familias *rep* y en nueve cepas no se identificó ninguna familia *rep* ni SU (8,7%). Las familias *rep* más frecuentes fueron la *rep*₇ (50%, n=46), *rep*₁₀ (38%, n=35), *rep*₂₁ (34,8%, n=32) y *rep*₂₂ (30,4%, n=28). Estas familias *rep* se identificaron tanto en cepas SARM como SASM de origen humano, animal y alimentario, exceptuando la familia *rep*₂₂ que sólo se detectó en cepas SARM.

En la **Tabla 80** se detallan las características de todas las cepas incluidas en este estudio y las familias *rep* detectadas.

Tabla 78.- Familias *rep* y secuencias únicas detectadas en la 92 cepas de *S. aureus* según su resistencia a meticilina, su origen y su complejo clonal.

Resistencia a meticilina	Origen	Complejo Clonal (CC)	Nº cepas estudiadas	Nº de cepas positivas para las:														Nº de cepas que no presentan ninguna familia <i>rep</i> /SU			
				Familias <i>rep</i>														Secuencias únicas			
				2	5	6	7	7b	9	10	10b	13	15	16	20	21	22	pE194	pKKS825		
SARM	Humano	CC398	43	1	1	1	29	4	2	19	1	3				13	10	1	4	4	
		CC5	9							5			1			1	9				
		CC228	3												3	3					
		CC247	2				2										2				
		CC1	1		1		1			1			1	1							
		CC8	1				1			1						1		1			
		CC30	1		1					1				1							
	Animal	CC398	5		1		4			2	1					1	3				
	Alimento	CC398	2				1	1		2							2	1		1	
		CC5	2							1								2			
CC22		1		1											1						
SASM	Animal	CC398	9				4			2						6				1	
		CC30	9				2			1						5				3	
		CC9	4				2									1				1	
Total			92	1	5	1	46	5	2	35	2	3	2	2	5	32	28	1	5	9	

Análisis detallado de 18 cepas SARM seleccionadas

Se seleccionaron 18 cepas SARM provenientes de la colección de la Universidad de La Rioja, las cuales formaban parte de otros apartados de esta tesis, para un estudio más exhaustivo del contenido plasmídico. Esta serie incluía cepas de todas las familias *rep* detectadas. Se secuenciaron todos los amplicones obtenidos para estas cepas en las diferentes PCRs de las familias *rep* y de las SUs. Se determinó el número y el tamaño de los plásmidos, mediante extracción plasmídica y posterior electroforesis (para la determinación de plásmidos de tamaño <3 kb) y mediante la técnica de S1-PFGE. Además, los geles obtenidos fueron transferidos a membranas de nylon que se hibridaron con sondas específicas de cada familia *rep*. En los casos en que no se obtuvieron resultados positivos, se llevó a cabo la hibridación de *I-CeuI*-PFGE con las sondas de las familias *rep* y la sonda de ARNr 16S para determinar la posible localización cromosómica de estos genes *rep*. En la **Tabla 79** se muestran los resultados obtenidos en estas 18 cepas.

➤ Número y tamaño de los plásmidos portadores de los diferentes genes *rep*: se observó un alto número de plásmidos (de 3 a 8 plásmidos) de tamaños muy diferentes (desde 500 a 2,5 kb) en todas las cepas estudiadas. Según los resultados obtenidos de la secuenciación de todos los amplicones, las cinco cepas positivas para la familia *rep*₅ contenían genes *rep* idénticos a los presentes en los plásmidos pSAS y pRJ6. Estos genes *rep* hibridaron en plásmidos de tamaños muy variables (de 300 kb a 20 kb). Las cepas que presentaron genes *rep* de la familia *rep*₇ presentaron genes similares a los de los plásmidos pSBK203, SASM476, pK214 y pS0385-2. Estos genes *rep* hibridaron con plásmidos desde 400 kb hasta 10 kb. En dos cepas con amplicones de la familia *rep*₇ no se pudo determinar si su localización era plasmídica o cromosómica ya que no se obtuvieron resultados en ninguna de las hibridaciones realizadas. Los amplicones obtenidos en las familias *rep*_{7b}, *rep*₁₀ y *rep*_{10b} fueron idénticos a los genes *rep* de los plásmidos pVGA, pDLK1 y SAP104B respectivamente. Los tamaños de los plásmidos en los que hibridaron fueron diferentes según la familia *rep*, de modo que la familia *rep*₁₀ hibridó en plásmidos de 2,5 kb, la *rep*_{7b} en plásmidos de 90 kb, 18 kb y 6 kb y la *rep*_{10b} en plásmidos de 280 kb, 80 kb, 9 kb. La cepa portadora de un gen *rep* de la familia *rep*₁₅ resultó portadora del mismo gen *rep* que el plásmido pUSA03 y dicho gen se encontró en un plásmido de 250 kb. La familia *rep*₁₆ fue detectada en un plásmido de

300 kb (idéntico al gen *rep* de SAP019A) y en dos plásmidos de 25 kb y 70 kb (idénticos al de pSAS). Las cepas con genes *rep* de la familia *rep*₂₀ presentaron genes similares a los de los plásmidos SAP102A y pTW20_1 en plásmidos de 350 kb, 120 kb y 70 kb. Los genes *rep* detectados de la familia *rep*₂₁ hibridaron con plásmidos de pequeño tamaño (2,5 kb) y fueron similares a los identificados en pKH21, pBMSa1 y pS0385-3. Sin embargo, en una de las cepas su localización no pudo ser determinada al no obtenerse resultados en las hibridaciones. Los genes *rep* pertenecientes a la familia *rep*₂₂ resultaron idénticos a los genes *rep* de los plásmidos pKKS825 y pKKS627 y los tamaños de los plásmidos variaron desde 280 kb a 8 kb. La SU pKKS825 se detectó en plásmidos de tamaños ≤ 40 kb.

➤ Posible localización plasmídica de genes de resistencia: según las secuencias obtenidas de los genes *rep* amplificados, se supuso la presencia de los plásmidos en los cuales dichos genes fueron primeramente descritos. Posteriormente y según los datos del GenBank y de la bibliografía consultada, se analizó si estos plásmidos contenían genes de resistencia que se hubiesen detectado en nuestras cepas por PCR. De esta forma se estableció que estos genes pudiesen estar localizados en dichos plásmidos lo que se indica en la **Tabla 79**. Así, 10 de las 11 cepas portadoras de un gen *rep* similar al del plásmido pDLK1 (familia *rep*₁₀) contenían el gen *erm*(C). En el caso de la cepa C1569 este gen de resistencia podría estar también localizado en el plásmido pUSA03 (familia *rep*₁₅). Los plásmidos pKH21 y pBMSa1 contienen el gen *lnu*(A), y dos de las cinco cepas con genes *rep* similares a los de estos plásmidos contenían dicho gen. El gen *rep* del plásmido pGO1 (*rep*₂₁), el cual presenta el gen de resistencia *ant*(4')-Ia, se detectó en la cepa K264 aunque la localización de este gen *rep* fue desconocida. El plásmido pVGA contiene el gen *vga*(A) y en todas las cepas con genes *rep* de la familia *rep*_{7b} se identificó este gen. Dos de las cepas positivas para la familia *rep*₂₂ (C1813 y C1857) portaban los genes *tet*(L) y *dfrK* al igual que el plásmido pKKS627. Otras dos cepas (K294 y K418) contenían el gen *ant*(4')-Ia el cual se encuentra localizado en el plásmido pUB110 que presenta un gen *rep* idéntico al plásmido pKKS627. El plásmido pKKS825 contiene tres genes *rep* que pertenecieron a la familia *rep*₂₂ y a dos SUs en este estudio y porta los genes de resistencia *vga*(C), *ant*(4')-Ia, *tet*(L), y *dfrK*. En tres cepas se identificó dos de los tres genes *rep* del plásmido pKKS825 junto a los genes de resistencia *tet*(L) y *ant*(4')-Ia.

Tabla 79.- Contenido plasmídico y relación entre plásmidos y genes de resistencia de las 18 cepas SARM seleccionadas^a.

Cepa	CC	Plásmidos detectados			Hibridación		Genes de resistencia que podrían estar incluidos en los diferentes plásmidos ^h
		Familias- <i>rep</i> ^b	Nº plásmidos ^c	Tamaño de los plásmidos (kb) ^c	Tamaño del plásmido	Plásmido tipo ^f (familia- <i>rep</i>)	
C1894	CC398	7b, 10, 21, 22, SU ^d	7	300, 250, 90, 40, 15, 6, 2.5	90	pVGA (7b)	<i>vga(A)</i>
					40	pKKS825 (22)	<i>tet(L)</i> , <i>ant(4')-Ia</i>
						pKKS825 (SU)	<i>tet(L)</i> , <i>ant(4')-Ia</i>
					15	pKKS825 (SU)	<i>tet(L)</i> , <i>ant(4')-Ia</i>
					6	pKKS825 (SU)	<i>tet(L)</i> , <i>ant(4')-Ia</i>
	2.5	pDLK1 (10)	<i>erm(C)</i>				
		pKH21 (21)					
C1890	CC22	5, 20	3	350, 47, 23	350	SAP102A (20)	
					47	pSAS (5)	
					23	pSAS (5)	
K264	CC5	10, 21 ^e , 22	4	47, 20, 4.5, 2.5	20	pKKS825 (22)	<i>ant(4')-Ia</i>
					2.5	pDLK1 (10)	
K294	CC30	5, 10, 16, 22	5	300, 60, 30, 4, 2.5	300	pSAS (5)	
						SAP019A (16)	
					60	pKKS627 (22) ^g	<i>ant(4')-Ia</i>
					30	pSAS (5)	
		2.5	pDLK1 (10)	<i>erm(C)</i> ,			
K418	CC8	7, 10, 20, 22	6	350, 120, 70, 40, 15, 2.5	350	pSBK203 (7)	
						pTW20_1 (20)	
					120	pTW20_1 (20)	
					70	pTW20_1 (20)	
						2.5	pKKS627 (22) ^g
		2.5	pDLK1 (10)	<i>erm(C)</i>			
C1569	CC1	5, 7, 10, 15, 16	7	500, 400, 250, 70, 40, 25, 2.5	400	SASM476 (7)	
					250	pUSA03 (15)	
					70	pSAS (5)	
						pSAS (16)	
					40	pSAS (5)	
					25	pSAS (16)	
		2.5	pDLK1 (10)	<i>erm(C)</i>			

Tabla 79.- Continuación.

Cepa	CC	Plásmidos detectados			Hibridación		Genes de resistencia que podrían estar incluidos en los diferentes plásmidos ^h
		Familias- <i>rep</i> ^b	Nºplásmidos ^c	Tamaño de los plásmidos (kb) ^c	Tamaño del plásmido	Plásmido tipo ^f (familia- <i>rep</i>)	
C1570	CC398	7, 10, 21	5	12, 5, 4.3, 4, 2.5	12 2.5	pSBK203 (7) pDLK1 (10) pKH21 (21)	<i>erm</i> (C)
C1576	CC398	7, 21	6	450, 65, 35, 12, 6.5, 2.5	12 2.5	pSBK203 (7) pBMSa1 (21)	<i>lnu</i> (A)
C1571	CC398	7, 10	6	200, 112, 45, 20, 5, 2.5	200 45 20 2.5	pK214 (7) pK214 (7) pK214 (7) pDLK1 (10)	<i>erm</i> (C)
C1813	CC398	7b, 10, 21, 22, SU	8	300, 245, 90, 50, 18, 6.7, 6, 2.5	90 50 18 6.7 2.5	pVGA (7b) pKKS627(22) pVGA (7b) pKKS825 (SU) pKKS825 (SU) pDLK1(10) pBMSa1 (21)	<i>vga</i> (A) <i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrK</i> <i>vga</i> (A) <i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrK</i> <i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfrK</i> <i>erm</i> (C)
C2354	CC398	7 ^e , 7b	7	300, 280, 150, 80, 20, 9, 6	6	pVGA (7b)	<i>vga</i> (A)
C2669	CC398	5, 7 ^e , 10b	6	300, 280, 160, 80, 20, 9	280 80 9	pRJ6 (5) SAP104B (10b) pRJ6 (5) SAP104B (10b) SAP104B (10b)	
C1857	CC398	7, 10, 21, 22	8	500, 280, 97, 60, 40, 20, 15, 2.5	280 20 2.5	pKKS627 (22) pK214 (7) pDLK1 (10) pBMSa1 (21)	<i>tet</i> (L), <i>dfrK</i> <i>erm</i> (C) <i>lnu</i> (A)
C1840	CC398	7, 22	7	500, 280, 97, 60, 40, 10, 5	280 97 10	pKKS825 (22) pK214 (7) pK214 (7)	

Tabla 79.- Continuación.

Cepa	CC	Plásmidos detectados			Hibridación		Genes de resistencia que podrían estar incluidos en los diferentes plásmidos ^h
		Familias- <i>rep</i> ^b	Nºplásmidos ^c	Tamaño de los plásmidos (kb) ^c	Tamaño del plásmido	Plásmido tipo ^f (familia- <i>rep</i>)	
C2348	CC398	5, 7, 10b	7	200, 180, 80, 40, 20, 9, 5	200 180 80 40 20 9	pRJ6 (5) pS0385-2 (7) SAP104B (10b) pRJ6 (5) pRJ6 (5) SAP104B (10b)	
C2350	CC398	10, 21, 22, SU	4	130, 20, 9, 2.5	20 9 2.5	pKKS825 (SU) pKKS825 (22) pKKS825 (SU) pDLK1 (10) pS0385-3 (21)	<i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia <i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia <i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia <i>erm</i> (C)
C2876	CC398	SU	7	110, 20, 11, 10, 7, 6.5, 4.4	11	pBS-02 (SU)	
C2875	CC398	7b, 10, 22, SU	7	245, 90, 48, 23, 8, 6, 2.5	90 23 8 6 2.5	pVGA (7b) pKKS825 (SU) pKKS825 (22) pKKS825 (SU) pDLK1 (10)	<i>vga</i> (A) <i>erm</i> (C)

^aLos fenotipos y genotipos de resistencia de las cepas aparecen en la **Tabla 80**.

^bEl tipo de familia *rep* fue detectada por PCR y por secuenciación.

^cEl número y el tamaño de los plásmidos se determinó por extracción y electroforesis y por S1-PFGE.

^dSU, secuencia única.

^eLocalización desconocida debido a a que no se obtuvieron resultados en ninguna hibridación.

^fPlásmido tipo: plásmido que contiene un gen *rep* idéntico al detectado por secuenciación.

^gEl gen *rep* del plásmido pKKS627 es idéntico al gen *rep* del plásmido pUB110 es cual contiene el gen de resistencia *ant*(4')-Ia.

^hEstos genes de resistencia se detectaron por PCR y se indica su posible localización plasmídica.

Tabla 80.- Características y resultado obtenidos en las 92 cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio de plásmidos.

País	Cepa	SARM/ SASM^a	Origen^b	CC^c/spa	SCC^{mec}	Fenotipo de resistencia^d	Genotipo de resistencia	Familias rep
España	C1891	SARM	A	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, STR	<i>tet(K), tet(M), erm(A), erm(C)</i>	7, 10, 21
	C1894	SARM	A	CC398/t1197	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, TOB, KAN	<i>tet(K), tet(L), tet(M), erm(C), msr(A)/msr(B), vga(A), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	7b, 10, 21, 22, SU ^e
	C1533	SARM	A	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERI, CLI, TOB, KAN, CIP	<i>erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	10, 22
	C1532	SARM	A	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	22
	C1890	SARM	A	CC22/t032	IV	PEN, OXA, CIP, LEV		5, 20
	K264	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, KAN, CIP, LEV, FOS	<i>ant(4')-Ia</i>	10, 21, 22
	K287	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERI, CLI, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(B), msr(A)/msr(B), ant(4')-Ia</i>	22
	K292	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERI, CLI, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(C), ant(4')-Ia</i>	10, 22
	K294	SARM	H	CC30/t012	III	PEN, OXA, ERI, CLI, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), ant(4')-Ia</i>	5, 10, 16, 22
	K370	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(A), erm(B), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	10, 22
	K168	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>ant(4')-Ia</i>	22
	K388	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>ant(4')-Ia</i>	10, 22
	K415	SARM	H	CC5/t067	IV	TOB, CIP, LEV	<i>ant(4')-Ia</i>	15
	K126	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERI, CLI, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(B), erm(C), ant(4')-Ia</i>	10, 22
	K181	SARM	H	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>ant(4')-Ia</i>	22
	K418	SARM	H	CC8/t008	IV	PEN, OXA, ERI, CLI, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(C), ant(4')-Ia</i>	7, 10, 20, 22
	K118	SARM	H	CC228/t109	I	PEN, OXA, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	20, 21
	K413	SARM	H	CC228/t1318	I	PEN, OXA, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>erm(A), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	20, 21
	K102	SARM	H	CC228/t1318	I	PEN, OXA, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV, FOS	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	20, 21
	K392	SARM	H	CC247/t051	I	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>tet(K), tet(M), tet(L), erm(A), erm(B), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	7, 22
	K399	SARM	H	CC247/t051	I	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV	<i>tet(M), erm(A), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	7, 22
	C1569	SARM	H	CC1/t127	II	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	<i>tet(K), tet(L), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrK</i>	5, 7, 10, 15, 16
	C1570	SARM	H	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI	<i>tet(K), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B)</i>	7, 10, 21

Tabla 80.- Continuación.

País	Cepa	SARM/ SASM^a	Origen^b	CC^c/spa	SCC^{mec}	Fenotipo de resistencia^d	Genotipo de resistencia	Familias rep
España	C1576	SARM	H	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>tet(K), tet(L), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), lnu(A), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	7, 21
	C1571	SARM	H	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>tet(K), tet(L), tetM, erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B),</i>	7, 10
	C1660	SARM	H	CC398/t1255	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI	<i>tet(K), tet(L), tet(M), erm(C), msr(A)/msr(B),</i>	7, 10
	C1813	SARM	H	CC398/1197	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>tet(K), tet(L), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), vga(A), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrK</i>	7b, 10, 21, 22, SU
	C1650	SARM	P	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>tet(K), tet(L), tet(M), erm(A), erm(B), erm(C), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa</i>	10
	C2354	SARM	H	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, CLI, CIP, LEV	<i>tet(K), tet(M), vga(A)</i>	7, 7b
	C2669	SARM	P	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, CLI, CIP, LEV	<i>tet(K), tet(M)</i>	5, 7, 10b
	C1857	SARM	H	CC398/ t108	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, TOB, KAN, SXT	<i>tet(L), erm(A), erm(C), lnu(A), dfrK</i>	7, 10, 21, 22
	C1858	SARM	H	CC398/ t588	V	PEN, OXA, ERI, CLI, TET, TOB, KAN, SXT	<i>tet(K), tet(L), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), dfrS1, dfrK</i>	7, 10, 21
	C1859	SARM	H	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, SXT	<i>tet(L), dfrK</i>	7, 22
	C1840	SARM	P	CC398/ t108	V	PEN, OXA, TET, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	<i>tet(L), lnu(A), dfrS1, dfrK</i>	7, 22
	C1849	SARM	P	CC398/ t011	IV	PEN, OXA, TET, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>tet(L), tet(M), aph(2'')-acc(6'), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrG, dfrK</i>	7, 21, 22
	C1842	SARM	P	CC398/ t011	IV	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), ant(4')-Ia, aph(3')-IIIa, dfrS1, dfrK</i>	7, 10, 22
	C2895	SARM	H	CC398/t1451	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI	<i>tet(K), tet(M), erm(C)</i>	7, 7b, 10
	C1992	SARM	H	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, GEN, TOB, KAN	<i>tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A)/msr(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia</i>	10, 21
	C2348	SARM	H	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, CIP, LEV, SXT	<i>tet(K), erm(B), dfrK</i>	5, 7, 10b
	C2350	SARM	H	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, TOB, KAN	<i>tet(L), erm(B), erm(C), ant(4')-Ia</i>	10, 21, 22, SU
	C2876	SARM	H	CC398/t899	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, TOB, KAN	<i>tet(K), tet(L), tet(M), erm(C), ant(4')-Ia</i>	SU
	C2875	SARM	H	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERI, CLI, TOB, KAN	<i>tet(L), tet(M), erm(C), vga(A), ant(4')-Ia</i>	7b, 10, 22, SU
	C2767	SARM	H	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET	<i>tet(M)</i>	21

Tabla 80.- Continuación.

País	Cepa	SARM/ SASM^a	Origen^b	CC^c/spa	SCC^{mec}	Fenotipo de resistencia^d	Genotipo de resistencia	Familias rep
Dinamarca	102/M-1-B-FAA	SASM	P	CC398/t2462	-		NR ^f	21
	111/74-13479-1	SASM	P	CC30/t1333	-	PEN, ERI	NR	21
	115/3-S-1	SARM	P	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	NR	7, 13
	116/9-B	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, ERI, TET, TMP	NR	7, 10, 21
	130/73-10169-1	SASM	P	CC398/t034	-	TET	NR	7, 21
	131/72-15311-1	SASM	P	CC30/t1333	-	PEN, TET	NR	7
	132/74-10089-1	SASM	P	CC30/t1333	-		NR	
	133/74-12791-1	SASM	P	CC398/t034	-	PEN, TET, STR, TMP	NR	7
	134/74-13093-4	SASM	P	CC398/t034	-	PEN, TET, ERI, TMP	NR	21
	137/2007-70-52-4	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	NR	7
	142/74-13714-1	SASM	P	CC398/t034	-	PEN, TET, TMP	NR	21
	143/73-11242-1	SASM	P	CC398/t034	-	ERI, TET, STR	NR	7, 10
	144/74-13727-1	SASM	P	CC398/t034	-	PEN, TET, ERI	NR	10, 21
	145/74-13532-2	SASM	P	CC398/t011	-	PEN, TET	NR	
	146/75-12166-1	SASM	P	CC398/t034	-	PEN, TET, ERI, TIA, STR, TMP	NR	7, 21
	216/73-10127-2	SASM	P	CC30/t1333	-	PEN	NR	
	217/74-11696-1	SASM	P	CC30/t1333	-	TET, STR	NR	7, 21
	222/72-12400-1	SASM	P	CC30/t1333	-		NR	
	223/72-13076-1	SASM	P	CC30/t1333	-	PEN	NR	21
	224/72-13279-1	SASM	P	CC30/t1333	-		NR	21
	225/72-14665-1	SASM	P	CC30/t1333	-	TIA, TMP	NR	21
	226/73-10164-1	SASM	P	CC9/t337	-	SMX	NR	10
	227/73-12750-1	SASM	P	CC9/t337	-	PEN, TIA, SMX, TMP	NR	
	228/74-10095-1	SASM	P	CC9/t337	-	PEN, TIA, STR, TIA, TMP	NR	7, 21
	229/72-10804-1	SASM	P	CC9/t337	-	PEN, TMP	NR	7
	2008-60-3431	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TMP, STR	NR	7
	2007-70-70-1	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, TMP	NR	
	170/2007-70-71-1	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, TMP	NR	SU

Tabla 80.- Continuación.

País	Cepa	SARM/ SASM ^a	Origen ^b	CC ^c / <i>spa</i>	SCC ^{mec}	Fenotipo de resistencia ^d	Genotipo de resistencia	Familias <i>rep</i>
Dinamarca	95018	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, TIA, STR, TMP, SMX	NR	13
	98699	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, STR, TMP	NR	7
	2008-60-3397	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, CIP, TMP	NR	10
	2008-60-3326	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	NR	7
	2008-60-3254	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, STR, TMP	NR	7, 10
	2008-60-2816	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, GEN, STR, TMP, SMX	NR	7
	2008-60-2593	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, ERI, GEN, STR, TMP, SMX, SXT	NR	2, 7, 9, 21
	2008-60-970	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	NR	7, 21
	2007-70-77-4	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET	NR	
	2007-70-91-4	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TMP	NR	7
	2008-243-2	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TMP	NR	
	2008-251-4-1	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, LIN, TIA, GEN, STR, TMP, SMX	NR	6, 7, 13
	2008-70-269-2	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, LIN	NR	7, 10
	2008-70-151-1	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, GEN, STR, TMP, SMX, CIP	NR	
	F1-A-S	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI	NR	7, 10
	2A3S	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, LIN, TMP	NR	10, 21
	Nr10 72398	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, TIA, STR, TMP, SMX, CIP	NR	7, 10, 21, 22
	Nr35 62450	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, LIN, TIA, GEN, STR, TMP, SMX, CIP	NR	7, 9, 10, 22
	2008-70-300-1	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERI, LIN, TIA, STR, TMP, CIP	NR	7, 10, 22
	2008-70-301-1	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, LIN, TIA, STR, TMP, CIP	NR	7, 22
	Nr17 104659	SARM	P	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, STR, TMP, CIP	NR	7, 22

^aSARM, *S. aureus* resistente a meticilina; SASM, *S. aureus* sensible a meticilina.

^bA, alimento; H, humano; P, porcino.

^cCC, complejo clonal.

^dPEN, penicilina; OXA, oxacilina; TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; CLI, clindamicina; LIN, lincomicina; TIA, tiamulina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomicina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina, TMP, trimetoprim; SMX, sulfametoxazol; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; ^l, Resistencia intermedia.

^eSU, secuencia única.

^fNR, no realizado.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio epidemiológico y molecular de cepas SARM de diferentes orígenes con el fin de conocer más sobre la propagación y las características de este microorganismo. Debido a la emergencia de nuevas variantes genéticas conocidas como SARM-AG, gran parte del trabajo se ha centrado en la detección de cepas SARM CC398 en nuestro país. Se ha profundizado, además, en el estudio de mecanismos de resistencia inusuales que pudiesen estar asociados a linajes clonales de origen animal. Por último, se ha llevado a cabo el estudio de elementos genéticos móviles, y en especial de plásmidos de *S. aureus*, con el fin de conocer más sobre los mecanismos de diseminación de genes de resistencia.

Casos clínicos causados por cepas SARM CC398 en pacientes con relación laboral con ganado porcino

Debido a la emergencia de nuevas variantes genéticas SARM asociadas al ganado y más concretamente de CC398, uno de los objetivos de este trabajo fue detectar casos clínicos producidos por cepas pertenecientes a este complejo clonal en nuestro país ya que, al inicio de esta tesis, no existían datos al respecto. Para ello, durante un periodo de 3 años se analizaron aquellos casos sospechosos de ser producidos por SARM CC398 en un hospital español. Conviene destacar que dicho hospital se hallaba en una zona donde la densidad de explotaciones porcinas era y es muy elevada. Se detectaron un total de 7 casos clínicos, y en todos ellos se estudió el estado de portador de los pacientes y sus familiares. Cuatro de los pacientes tenían relación laboral directa con el ganado porcino, dos convivían con familiares que trabajaban en una granja, y en otro de los casos, la paciente no tenía relación laboral con animales pero su padre, con el que no convivía, sí que había sido granjero hacía ya 10 años. Son varios los estudios que han demostrado que el contacto con animales de granja constituye un factor de riesgo para la colonización por SARM CC398 (Voss et al., 2005, Lewis et al., 2008; van Loo et al., 2007a; Krziwanek et al., 2009). En cuatro de nuestros casos la relación laboral y el contacto directo con cerdos así como la transmisión interespecie explicaría el origen de la infección. En otros dos, la transmisión de SARM CC398 de humano a humano podría ser la causante, algo que ha sido ya observado con anterioridad (Khanna et al., 2008; Lewis et al., 2008; Voss et al., 2005). En el caso restante, la transmisión interhumana y el estado prolongado de portador serían la explicación más plausible para la detección de esta línea genética. Aunque algunos estudios han establecido que la

capacidad de SARM CC398 para transmitirse entre humanos es menor que la de otras líneas genéticas (van Rijen et al., 2009; Wassenberg et al., 2011), la presencia de CC398 en los familiares de granjeros ha sido reportada en varias ocasiones (Khanna et al., 2008; Lewis et al., 2008; Voss et al., 2005). Muestra de ello es que, en 6 de nuestros casos algún familiar o conviviente próximo presentó cepas SARM CC398.

Con el fin de establecer la posible transmisión de cepas SARM CC398 del animal al hombre, se muestrearon también, las explotaciones porcinas relacionadas con los diferentes casos clínicos. De las seis granjas analizadas, en cuatro de ellas se obtuvieron cepas SARM CC398. La prevalencia de individuos sanos portadores de SARM fue muy variable según la granja, desde la no detección o la identificación en un 30-50%, hasta porcentajes >90%. Las tasas de animales colonizados por SARM varían también considerablemente de unas granjas a otras en los diferentes países (desde 0% hasta 91%), así en estudios llevados a cabo en Irlanda, Suiza, Singapur, Japón, Corea, Malasia y Brasil (Sergio et al., 2007; Baba et al., 2010; Neela et al., 2009; Horgan et al., 2010; Aquino et al., 2012; Lim et al., 2012; Huber et al., 2010) se ha detectado colonización en menos del 5% de los animales, en cambio en España y Canadá (Gómez-Sanz et al., 2010; Khanna et al., 2008) el porcentaje colonizado fue del 20 al 50% y en algunos estudios realizados en Holanda o Alemania (van Duijkeren et al., 2007; Tenhagen et al., 2009) se identificaron cepas SARM en más del 70% de los cerdos analizados. Además, las cifras encontradas en el mismo país también difieren en muchos casos. De esta forma en diferentes estudios llevados a cabo en Dinamarca, Bélgica, Holanda, Alemania y EEUU se han obtenido porcentajes de SARM que van desde el 1 al 90% (van Duijkeren et al., 2007; van Duijkeren et al., 2008; Guardabassi et al., 2007; Lewis et al., 2008; Tenhagen et al., 2009; Pletinckx et al., 2011; Denis et al., 2009; Smith et al., 2009). Estos niveles de SARM dependen de las granjas, el tipo y la edad de los animales y, sobre todo, de la metodología utilizada para el aislamiento de las cepas (Graveland et al., 2009). En cualquier caso, en este trabajo el número de cerdos estudiados en las 6 explotaciones porcinas fue bajo por lo que se necesitaría una muestra de cerdos mayor para establecer la prevalencia real.

Siendo el objetivo principal del estudio de colonización en los animales de las granjas, la determinación del posible origen animal de las cepas SARM, podemos decir que en cuatro de los casos, los resultados obtenidos sugieren una posible transmisión del animal al hombre. Si observamos las características fenotípicas y genotípicas de las

cepas, así como el tipado molecular de las mismas, y los patrones de PFGE obtenidos, podemos afirmar que las mismas cepas fueron halladas en muestras de los pacientes y/o familiares y en muestras de los animales. Se han encontrado similares hallazgos en otros trabajos, en los que se ha establecido la transmisión entre cerdos y trabajadores o familiares (Pan et al., 2009; Huber et al., 2010). Conviene destacar que la detección del primer caso de SARM CC398 en este estudio fue simultánea a la identificación de cepas pertenecientes al CC398 en nuestro país por parte de otro grupo de investigación (Potel et al., 2010). Es importante mencionar que las cepas de dicho estudio pertenecían a una colección del 2006 tratándose de tres pacientes, dos de ellos propietarios de cerdos y el tercero de un ternero. Así, otros autores han observado la transmisión de SARM CC398 desde otras especies animales (vacas y caballos) al ser humano (van Duijkeren et al., 2011; Graveland et al., 2010; van Cleef et al., 2011).

Respecto a los determinantes de virulencia de cepas SARM CC398, consultando la bibliografía podemos decir que, en general, son poco virulentas (Argudín et al., 2011). Hasta el momento, solo se han descrito dos casos producidos por cepas SARM CC398 LPV-positivas en Suecia y en China (Welinder-Olsson et al., 2008; Yu et al., 2008) y uno producido por SARM LPV-positiva en Francia (Rasigade et al., 2010). En el presente trabajo, todas las cepas SARM CC398 detectadas a partir de los pacientes, familiares y animales fueron negativas para los genes de virulencia estudiados (*lukF-PV/lukS-PV*, *tst-1*, *eta*, *etb* y *etd*).

La menor detección de toxinas en esta línea genética explicaría que cepas SARM CC398 causan en su mayoría IPPB (Edelsberg et al., 2009). Si consideramos los siete casos clínicos incluidos en este trabajo, en seis de ellos, las cepas SARM CC398 fueron obtenidas a partir de lesiones cutáneas sin gravedad. Sin embargo, no se debe bajar la guardia ya que se han identificado cepas SARM CC398 en infecciones graves como neumonías o endocarditis (Hartmeyer et al., 2010; Krziwanek et al., 2009; Mammina et al., 2010; Pan et al., 2009; Wulf et al., 2008). A este respecto, en nuestro estudio, el paciente del caso siete sufrió una grave infección respiratoria con empiema causada por SARM CC398 que fue tratada con antimicrobianos a los que la cepa era resistente (levofloxacino) y falleció a consecuencia de un fallo multiorgánico. Conviene destacar, no obstante, que este paciente tenía una neoplasia pulmonar, y que esta situación de inmunodeficiencia pudo favorecer la gravedad del proceso causado por la cepa SARM CC398.

La presencia de un bajo número de factores de virulencia en cepas SARM CC398, contrasta claramente con el elevado número de determinantes de resistencia que suelen contener. La mayor parte de las cepas SARM CC398 muestran resistencia a tetraciclina, lo que se postula que puede ser debido al elevado uso de oxitetraciclinas en animales (Wulf et al., 2008). En nuestro estudio, todas las cepas SARM CC398 mostraron resistencia a tetraciclina y contenían los genes *tet(K)*, *tet(L)* y/o *tet(M)*, hallándose en la mayoría de los casos más de un gen de resistencia a este antibiótico. Se ha observado que en cepas SARM CC398 los genes *tet(K)* y *tet(M)* están normalmente localizados en el cromosoma y el gen *tet(L)* en plásmidos (Kadlec et al., 2012). Aunque la frecuencia de detección del gen *tet(L)* en estafilococos de origen animal es, en general baja (Schwarz et al., 1998), en cepas SARM CC398 estas frecuencias son mayores habiéndose identificado normalmente junto a otros genes de resistencia a tetraciclina (Feßler et al., 2010; Feßler et al., 2011a; Kadlec et al., 2009b; Argudín et al., 2011).

Se han descrito cepas SARM CC398 resistentes, además de a β -lactámicos y tetraciclinas, a macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, trimetoprim y, en menor medida, a quinolonas (Argudín et al., 2011; Feßler et al., 2011a; Vanderhaeghen et al., 2010b). En este estudio, muchas de las cepas SARM CC398 presentaron el fenotipo de resistencia MLS_B . En estafilococos la resistencia a macrólidos, lincosamidas y streptograminas (MLS) se debe principalmente a la presencia de genes *erm*, los cuales codifican metilasas del 23S ARNr. En nuestro estudio se detectaron los genes *erm(A)*, *erm(B)* y *erm(C)* además de los genes de resistencia a macrólidos *msr(A)/msr(B)*. El gen *erm(C)* fue el más habitual, y normalmente se detectó en combinación con el gen *erm(A)*. Los genes *erm(A)*, *erm(B)* y *erm(C)* son los encontrados más comúnmente en cepas SARM CC398 (Kadlec et al., 2009a; Kehrenberg et al., 2009; Schwarz et al., 2008; Witte et al., 2007). Sin embargo, los genes *msr(A)/msr(B)* codificantes de bombas de expulsión activa, no parecen ser frecuentes en cepas de esta línea genética (Argudín et al., 2011). No obstante, destaca la detección en algunas cepas del fenotipo de resistencia poco habitual de resistencia a lincosamidas y sensibilidad a macrólidos. Se cree que este fenotipo podría estar emergiendo entre las cepas SARM-AG habiéndose detectado en cepas aisladas a partir de animales de granja, granjeros sanos y en cepas SARM obtenidas a partir del polvo de las granjas (Smith et al., 2009; Kadlec et al., 2010a). En las cepas resistentes a lincosamidas pero sensibles a macrólidos de

nuestro estudio, se detectaron los genes *lnu(A)* o *vga(A)*. En el momento de la detección del gen *lnu(A)* en las cepas de caso clínico número dos, no había datos de su presencia en SARM CC398, tratándose de la primera detección de este gen en esta línea genética. Estos genes han sido encontrado posteriormente por otros autores en cepas SARM CC398 (Argudín et al., 2011; Kadlec et al., 2010a).

Se encontraron, además, cepas SARM CC398 resistentes a aminoglucósidos, identificándose sobre todo el gen *ant(4')-Ia* y en menor medida los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* y *aph(3')-IIIa*. La resistencia a trimetoprim se debió principalmente a la presencia del gen *dfrK* que en algunos casos apareció junto al gen *dfrS1*. El gen *dfrK* fue descrito por primera vez en una cepa de SARM CC398 (Kadlec et al., 2009b) y se ha visto como está ampliamente distribuido en cepas de este linaje clonal (Feßler et al., 2010; Feßler et al., 2011a). Sin embargo, este gen no parece estar sólo en cepas CC398 sino que ya ha sido descrito en cepas SARM de otros CCs y en enterococos (Argudín et al., 2011; Gopegui et al., 2012; López et al., 2012). Como era de esperar, sólo algunas de las cepas fueron resistentes a quinolonas. En estas cepas se detectaron los cambios aminoacídicos Ser80Phe en GrlA y Ser84Leu en GyrA. En cualquier caso conviene destacar el fenotipo de multirresistencia identificado en muchas de las cepas SARM CC398. Se ha sugerido que estas cepas pueden actuar como reservorios y donadores de genes de resistencia con el consiguiente riesgo que ello conlleva (Kadlec et al., 2012).

La mayor parte de las cepas presentaron los tipos de *spa* t011 y t108. Ambos tipos junto con el t034, corresponden a los encontrados más comúnmente en los primeros estudios sobre SARM CC398 (Witte et al., 2007, van Belkum et al., 2008). Sin embargo, en trabajos posteriores, aparecen otros tipos de *spa* (Argudín et al., 2011; EFSA, 2009a; Golding et al., 2010; Gómez-Sanz et al., 2010), lo que indica una probable evolución de esta línea genética. SARM CC398-t011, CC398-t108 y CC398-t1255 han sido detectados sobre todo en cerdos y, en el caso de SARM CC398-t011 se ha encontrado también en pollos, vacas y caballos (Nemati et al., 2008; Graveland et al., 2010; Cuny et al., 2008; Van den Eede et al., 2009). Por otra parte, SARM CC398-t1197 y CC398-t1451 (menos frecuentes que los anteriores) se han identificado también en ganado equino (Witte et al., 2007; Van den Eede et al., 2009).

En cuanto a los tipos de SCC*mec* detectados en nuestras cepas, sólo se identificaron los tipos IVa y V. Estos dos tipos son los hallados más comúnmente en cepas SARM CC398 (Smith et al., 2010), aunque también se han descrito tipos de

SCC*mec* como una variante del VII, o el IX y el X en cepas de esta línea genética (Li et al., 2011; Price et al., 2012). Además, algunos autores proponen una relación entre el tipo de *spa* t011 y el tipo IVa de SCC*mec* y el tipo de *spa* t108 y el tipo V de SCC*mec* (Morgan, 2008). Si analizamos las cepas obtenidas en los siete casos clínicos vemos como esta relación se cumple en algunas de ellas y destaca el hecho de que todas las cepas de nuestro estudio con SCC*mec* IVa fueron *spa* t011. Sin embargo, muchas de las cepas SARM CC398-t011 presentaron el tipo V de SCC*mec*. Esto mismo se ha observado también por otros autores (Argudín et al., 2010). En cuanto al tipo de *agr* todas las cepas fueron tipo I que es el que se encuentra en cepas CC398 (Huijsdens et al., 2006; Denis et al., 2009; Argudín et al., 2011).

Aunque la gran mayoría de las cepas aisladas en estos casos fueron CC398 también se aislaron cepas pertenecientes a otros CCs. Es relevante la presencia de cepas SARM CC1 en la lesión de la paciente del primer caso y en la muestra nasal de su madre. Este linaje se asocia principalmente a SARM de tipo comunitario, es capaz de producir infecciones clínicamente relevantes (Layer et al., 2006; Otter et al., 2008) y está implicado en brotes hospitalarios (David et al., 2006). No obstante, se han encontrado cepas SARM CC1-t127 en granjas de cerdos en España, Italia y Chipre (EFSA, 2009a; Battisti et al., 2010) lo que sugiere el posible origen animal de esta línea genética. Además, se ha aislado SARM CC1 en vacas (Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007; Pilla et al., 2012) y caballos (Cuny et al. 2008), y en ambos casos, se estableció la posible transmisión del animal a los profesionales dedicados a su cuidado. Es posible, por tanto, que aunque no se detectaron cepas de esta línea genética en los animales analizados, las cepas detectadas en la paciente y en su madre tengan su procedencia en los cerdos de la granja. Esto podría explicarse por el hecho de que esta variante genética se hallase, quizás, colonizando a un pequeño porcentaje de los animales de la granja, no habiendo podido detectarse en el bajo número de cerdos analizados en este trabajo. En un estudio comparativo llevado a cabo con cepas CC1-t127 de origen humano y animal se sugirió la posible transmisión del animal al hombre de estas cepas (Franco et al., 2011). Considerando el fenotipo de multirresistencia detectado en ambas cepas de este trabajo y la habilidad de CC1-t127 de adaptarse a diferentes hospedadores, la vigilancia de este microorganismo resulta de vital importancia.

Otro CC detectado fue el CC188 el cual está relacionado con cepas SASM y de SARM asociadas a la comunidad (Ghaznavi-Rad et al., 2010; O'Brien et al., 2009). Este

CC se identificó en una cepa de origen porcino de la granja relacionada con el primer caso clínico. El ST de esta cepa fue el ST793 y su tipo de *spa* el t012. Esta cepa presentó además un fenotipo de multirresistencia portando seis genes de resistencia. El tipo de *spa* detectado en esta cepa se asocia principalmente al CC30 (Grundmann et al., 2010w), el cual se encontró a su vez en la paciente y los familiares del tercer caso clínico. En este caso las cepas fueron sensibles a meticilina y portaban el gen codificante de la TSST. La presencia de este factor de virulencia en cepas CC30 se ha observado con anterioridad (Deurenberg et al., 2009b).

Dinámica de colonización en personas en contacto con animales

El objetivo era analizar la dinámica de colonización nasal por SARM en personas en contacto con animales y la eficacia de la descontaminación con mupirocina en individuos con contacto profesional con animales colonizados. Para ello, se eligió el caso clínico número 1. Se llevó a cabo el tratamiento de todos los miembros de la familia con mupirocina y se evidenció, que los 4 miembros de la familia estaban libres de SARM en sus fosas nasales hasta una semana después de la aplicación de la mupirocina. No obstante, tanto el padre como la madre (trabajadores de la granja), fueron positivos para SARM a partir de las 3 semanas con distintas variantes de SARM CC398 y CC1. En el caso de la hija/paciente se observó que fue portadora intermitente, siendo detectada la primera muestra positiva para SARM a los 2 meses de la descolonización. El hermano, en cambio, fue negativo en todas las muestras tomadas (hasta ocho meses después del tratamiento). Hay que destacar que tanto la paciente como su hermano tenían un contacto más esporádico con los animales de la granja, y esto puede justificar la mayor eficacia del tratamiento de descontaminación con mupirocina. Todo esto concuerda con los resultados expuestos por otros autores en los que la presencia de SARM-AG en los granjeros, está intensamente asociada a su nivel de exposición a animales (Graveland et al., 2011b). Se observó, además, que la prevalencia de SARM en los trabajadores de granjas y sus familiares disminuía en periodos en los que el contacto con animales era menor.

Estudiando tanto la colonización nasal inicial de la familia, como las sucesivas recolonizaciones, vemos como existen similitudes entre las cepas aisladas. De esta forma, cepas con características parecidas colonizan a ambos hijos (C1570 y C1574) en

la primera toma de muestras y lo mismo ocurre en las sucesivas recolonizaciones (madre C1657 e hija C1697). Según esto, podemos pensar que además de la transmisión del animal a la persona, existe también transmisión entre personas de la misma familia. De esta forma, durante la toma inicial de muestras, no detectamos la presencia de SARM CC1-t127 y CC398-t011 (cepas encontradas en la lesión) en las fosas nasales de la paciente. Esto podría deberse a que SARM CC1-t127 y CC398-t011 estuviesen presentes en el momento de la toma de muestras pero no hubiésemos sido capaces de aislarlos, o bien a que la niña hubiese sido portadora transitoria de tales cepas, o bien a una posible transmisión madre-hija. No obstante, como se mencionó anteriormente, aunque la transmisión de cepas CC398 entre personas parece suceder como se ha observado en otros casos (Khanna et al., 2008; Lewis et al., 2008; Voss et al., 2005), se ha sugerido que la transferencia de CC398 entre personas es escasa si la comparamos con otros clones asociados a humanos (van Rijen et al., 2009; Wassenberg et al., 2011).

En cualquier caso, este elevado grado de colonización en todos los miembros de la familia tiene dos implicaciones a tener en cuenta: por un lado, el riesgo individual, de desarrollar infecciones por un patógeno multirresistente en personas sin factores de riesgo para ello; y por otro, la eficiente diseminación de cepas portadoras de numerosos y variados genes de resistencia. Sin embargo, debido a la baja eficacia de descontaminación de la mupirocina demostrada en personas con relación laboral con animales, se podría considerar no apropiado su uso en estos casos. Además, es conocido que la aplicación repetida y prolongada de mupirocina puede conllevar a resistencia a este antibiótico (Miller et al., 1996). Esto hace necesario establecer pautas para protocolizar el uso de mupirocina. En este sentido, se ha propuesto el uso profiláctico de la mupirocina en personas portadoras de SARM cuando entran en el sistema sanitario, con el fin de reducir la expansión de este microorganismo (Bode et al., 2010; van Rijen et al., 2008).

Prevalencia de SARM en muestras alimentarias de origen animal

En este estudio se analizaron 318 muestras de alimentos de origen cárnico con el fin de determinar la prevalencia de este microorganismo en alimentos crudos. Se encontró SARM en 5 de las 318 muestras analizadas (1,6%). La presencia de SARM en alimentos cárnicos ha sido estudiada en diferentes países del Centro y del Norte de

Europa, Asia o América (nunca antes en España) y en todos ellos el porcentaje encontrado ha sido muy variable (del 0 al 37%). Estas variaciones podrían deberse a la diferente metodología empleada (Corrente et al., 2007), al diferente número de muestras incluidas y a posibles diferencias geográficas. De esta forma, en estudios llevados a cabo en Suiza y Hungría, no se identificaron cepas SARM en ninguna de las muestras cárnicas analizadas (Huber et al., 2010; Kaszanyitzky et al., 2003) y en otros países como Italia, Francia, Japón, Corea o EEUU (Normanno et al., 2007; Kitai et al., 2005; Lee, 2003; Hanson et al., 2011; Kerouanton et al., 2007) se identificaron cepas SARM en menos del 2% de las muestras. Sin embargo, se encontraron tasas más altas en otros países europeos como en los Países Bajos un 2,5% (van Loo et al., 2007b) y un 11,9% (de Boer et al., 2009), en Estados Unidos un 5% (Pu et al., 2009), y en Canadá un 7,7% (Weese et al., 2010a). De especial relevancia es la prevalencia detectada en un estudio llevado a cabo recientemente en Alemania donde el 37% de las muestras contenían SARM (Feßler et al., 2011a). En nuestro estudio, no se puede establecer una correlación entre el tipo de carne y la tasa de contaminación por SARM debido a que el número de muestras incluidas de cada tipo de alimento fue muy diferente.

Lo que sí que se puede es conocer el origen de las cepas aisladas a partir de las muestras cárnicas gracias a las técnicas de tipado molecular. Así, SARM puede provenir del animal colonizado, o bien, puede tener origen humano por contaminación de la carne durante su manipulación. De esta manera, dos de las cepas de este trabajo pertenecieron al CC398, lo que sugiere el origen animal de las mismas. Se han identificado cepas SARM CC398 en alimentos en otros trabajos (de Boer et al., 2009; Feßler et al., 2011a; van Loo et al., 2007b; Weese et al., 2010a) destacando el estudio de Feßler et al., 2011a donde no sólo se obtuvo una elevada prevalencia de SARM (37%), sino que el 87,5% de las cepas fueron CC398. En este punto, resulta importante decir que nuestro trabajo constituyó el primer estudio de detección de cepas SARM CC398 en alimentos en nuestro país. Una de las cepas se aisló de una muestra de cerdo (SARM CC398-t011) y la otra cepa se obtuvo a partir de una muestra de ternera (SARM CC398-t1197). Como se ha mencionado anteriormente, aunque SARM CC398 se asocia principalmente con ganado porcino (Voss et al., 2005), se ha descrito también en otros animales como en el ganado vacuno (Graveland et al., 2010). Un dato que conviene destacar es que las dos cepas SARM CC398 presentaron resistencia a tetraciclina, característica fenotípica que, como hemos visto, se relaciona con SARM de

origen animal. Las dos cepas presentaron además, resistencia a macrólidos, lincosamidas y aminoglucósidos. Estos fenotipos de resistencia se pueden explicar por el uso específico de estos antibióticos en animales. Como hemos visto, la tetraciclina ha sido el antibiótico más comúnmente utilizado en estos animales, seguido de aminoglucósidos, macrólidos y lincosamidas, entre otros (OIE, 2007).

En cuanto a las otras tres cepas SARM encontradas en muestras cárnicas, dos pertenecieron a la línea genética CC5 (ST125-t067) y una a CC217 (ST217-t032). Estos CCs están relacionados con ambientes hospitalarios, lo que sugiere que su origen podría ser humano. En otros estudios también se han detectado cepas de líneas genéticas asociadas a humanos en muestras cárnicas (Pu et al., 2009; Waters et al., 2011) lo que indica que posiblemente estas cepas fueron transmitidas por los manipuladores de los alimentos. Conviene destacar las dos cepas SARM CC5-t067, aisladas de muestras de pollo y de conejo, ya que esta variante es la que se encuentra más frecuentemente en los hospitales españoles (Pérez-Vázquez et al., 2009). Las cepas SARM CC5-t067 suelen presentar resistencia simultánea a ciprofloxacina, tobramicina y eritromicina, presentando los genes de resistencia *ant(4')-Ia* y *msr(A)/msr(B)*. Nuestras dos cepas eran resistentes a quinolonas, una de ellas portaba ambos genes y la otra solo el gen *ant(4')-Ia*. En cuanto a la cepa SARM CC217-t032 fue aislada de una muestra de jabalí. No existen muchos estudios que hayan incluido muestras de caza. En este sentido, de Boer et al., 2009 encontró SARM en un porcentaje bajo de estas muestras (2,2%). SARM CC217 es una variante del EMRSA-15 (cepa endémica de Reino Unido) y presenta las características propias de un SARM nosocomial (Qi et al., 2005). Las cepas SARM CC217 descritas hasta el momento presentan altos niveles de resistencia a ciprofloxacina (Qi et al., 2005), hecho que concuerda con nuestros resultados.

El riesgo para el consumidor derivado de la presencia de SARM en los alimentos, depende fundamentalmente de la capacidad de este microorganismo para producir enterotoxinas. Como hemos mencionado anteriormente, las cepas CC398 suelen ser poco virulentas, habiéndose detectado algunos genes codificantes de enterotoxinas (*seb*, *sed*, *seg*, *sek* y *seq*) (Kadlec et al., 2009a; Laurent et al., 2009) o los genes de la LPV (Welinder-Olsson et al., 2008; Yu et al., 2008) sólo en unas pocas cepas. Así, nuestras cepas CC398 y la cepa CC217 sólo contenían genes de hemolisinas. Sin embargo, destaca la identificación de los genes codificantes de enterotoxinas que componen el operón *egc* en las dos cepas perteneciente al CC5-t067. Este resultado

concuerta con el hallado en otros estudios en cepas de esta línea genética (Holtfreter et al., 2007; Argudín et al., 2009). La presencia de estos genes en cepas aisladas a partir de alimentos es de gran preocupación ya que estas toxinas son las responsables de las intoxicaciones alimentarias. No obstante, hasta el momento, sólo se han descrito dos brotes de intoxicaciones causadas por SARM (Jones et al., 2002b; Kluytmans et al., 1995). Aunque, a priori, la presencia de SARM en alimentos parece ser baja, los últimos estudios reportan un aumento de su prevalencia en productos cárnicos (Feßler et al., 2011a; de Boer et al., 2009; Weese et al., 2010a). Por tanto, es importante continuar con su vigilancia ya que puede contribuir a la expansión de este microorganismo de tanta importancia clínica.

Prevalencia de SARM y SASM en muestras nasales de voluntarios sanos

En la población sana estudiada en este trabajo se detectó un grado de colonización nasal por *S. aureus* moderado, aislándose 53 cepas a partir de 278 muestras de voluntarios sanos (19,1%). La incidencia encontrada por otros autores difiere en función de la población analizada. Así, en nuestro estudio, no se incluyeron a personas que formasen parte de algún grupo de riesgo para ser portadoras de *S. aureus*. La tasa de colonización en la población en general suele ser de un 30% aproximadamente (Kluytmans et al., 1997; van Belkum et al., 2009), aunque se han observado variaciones según el procedimiento y la metodología de aislamiento utilizada. En cuanto al porcentaje detectado en nuestro estudio de SARM fue bastante bajo (0,36%), habiéndose identificado sólo una cepa con resistencia a meticilina. Las prevalencias de SARM entre personas sin factores de riesgo observadas en otros trabajos llevados a cabo en EEUU, Europa y Asia varían entre el 0,2 y el 2% (Kitti et al., 2011; Sakwinska et al., 2009; Shopsin et al., 2000b), aunque, en general, suelen ser menor de 1%.

La cepa de SARM obtenida perteneció a la línea genética CC6 (ST1649-t701) la cual se ha detectado con anterioridad en muestras nasales de portadores asintomáticos (Monecke et al., 2009; Schaumburg et al., 2011). Además, cepas SARM CC6 con el mismo tipo de *spa* (t701) se han observado en muestras clínicas de diferentes países (Ho et al., 2010; Kechrid et al., 2011). La cepa SARM CC6-t701 aislada en esta tesis presentó características propias de SARM-AC ya que fue sensible a los antibióticos no β -lactámicos testados, presentó el tipo de SCC*mec* IVc y el tipo de *agr* I. Estos

resultados eran los esperados ya que la persona de la cual se tomó la muestra no había tenido contacto con el sistema sanitario.

Mención especial merece la gran diversidad genética que se observó en las 53 cepas de *S. aureus* aisladas. Así se obtuvieron 37 tipos de *spa* diferentes de los cuales, 5 fueron nuevos. Esta característica ha sido también observada por otros autores entre cepas SASM (Sakwinska et al., 2009, Ben Slama et al., 2011). De hecho, se ha sugerido que SASM presenta, en general, una mayor diversidad clonal que SARM (Grundmann et al., 2010). Si analizamos los tipos de *spa* identificados vemos como la mayor parte se asocian al CC30 y en menor medida al CC5, CC15 y CC45. Se ha observado que los CC30 y CC45 se han expandido de manera exitosa llegando a colonizar a gran parte de la población de muchos países (Melles et al., 2008).

La identificación de dos cepas SASM CC398 en muestras nasales de dos individuos sanos es un dato destacable. Como vimos antes, este CC se relaciona con animales de producción y en especial con cerdos. No obstante, una característica de esta línea genética es que suele asociarse con resistencia a β -lactámicos y tetraciclina, algo que difiere con los resultados obtenidos en estas dos cepas. Además, ambas cepas se obtuvieron de personas sanas sin ningún factor de riesgo ni contacto con animales que pudiese explicar la presencia de este linaje clonal. En el momento de la detección de ambas cepas (año 2009) había ya algunos trabajos que describían cepas SASM CC398 (Cuny et al., 2009; Pan et al., 2009). Sin embargo, el origen de esta línea genética no se conocía y se pensaba que quizás las cepas SARM CC398 provenían de antecesores sensibles o bien que las primeras cepas fueron SARM que posteriormente perdieron el elemento *SCCmec* (Cuny et al., 2009). Posteriormente, han surgido varias publicaciones al respecto en las cuales se dice que las cepas SARM CC398 podrían haber surgido de cepas SASM CC398 humanas (Price et al., 2012; Uhlemann et al., 2012). Se señala, además, como preocupante que esta línea genética pudiese readaptarse a los humanos sin perder la afinidad que tiene por los animales. De esta manera, con dos hospedadores en los cuales poder desarrollarse y diseminarse, incrementaría tanto su virulencia como su resistencia frente a antimicrobianos (Baquero, 2012). Otro dato a destacar es que las dos cepas SASM CC398 aisladas en nuestro estudio contenían el gen de resistencia a macrólidos *erm(T)*. Este gen fue descrito por primera vez en estafilococos en una cepa de SARM CC398 de origen porcino (Kadlec et al., 2010b).

Dos cepas SASM pertenecieron al CC97 el cual está también asociado a animales y en especial a rumiantes (Rabello et al., 2007). Se trata de una de las causas más comunes de mastitis bovina y ha sido detectada en muestras de cerdos o de polvo de las granjas en nuestro país, en Italia y en Alemania (Gómez-Sanz et al., 2010; EFSA, 2009a). Esta línea genética también se ha encontrado en humanos en cepas clínicas en Reino Unido y EEUU (Sung et al., 2008; Chung et al., 2004). Como ocurría con las cepas SASM CC398, las personas a partir de las cuales se aislaron las cepas SASM CC97 no tenían contacto alguno con animales. Estas cepas fueron además sensibles a todos los antibióticos testados excepto a penicilina.

Conviene destacar también la identificación de una cepa SASM CC1-t127 la cual resultó sensible a todos los antibióticos testados. Cepas con estas características también se han observado con anterioridad en humanos (Nulens et al., 2008). Debido al aislamiento de cepas SARM CC1-t127 en animales en otros estudios (Cuny et al., 2008; Franco et al., 2011; Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007; Pilla et al., 2012) sería interesante determinar el origen de estas cepas para comprobar si algo similar a las cepas CC398 (Price et al., 2012) ha ocurrido también en esta línea genética.

La mayor parte de las cepas SASM (73,6%) de este estudio presentaron sensibilidad a todos los antibióticos testados, excepto a penicilina. Once cepas fueron resistentes a eritromicina y clindamicina en, lo que podría explicarse por el amplio uso de estos antimicrobianos en el tratamiento de infecciones producidas por agentes gram positivos (Lim et al., 2002).

Por otro lado, aunque se han descrito personas sanas portadoras de cepas con los genes de la LPV (Muttaiyah et al., 2010), ninguna de las cepas aisladas en este trabajo los presentaron. Se sabe que los genes *lukF-PV/lukS-PV* son movilizados por fagos y se cree que podrían haber sido transferidos desde cepas SASM a cepas SARM-AC (Deurenberg et al., 2009a). De ahí, la importancia de estudiar los determinantes de virulencia presentes en cepas SASM presentes en la población sana ya que estas cepas podrían favorecer la diseminación de los mismos. A tal efecto, el gen codificante de la TSST, el cual se relaciona con enfermedades severas, se observó en 15 de las cepas (28,3%). En otros estudios se han obtenido porcentajes similares (20-30%) en personas sanas (Mégevand et al., 2010). La mayor parte de las cepas positivas para el gen *tst* (73,3%) detectadas en este trabajo pertenecieron a la línea genética CC30. Este CC es uno de los más frecuentemente encontrados, tanto colonizando como causando

infecciones y se cree que podría haber evolucionado hasta convertirse en un exitoso agente colonizador del ser humano (van Belkum et al., 2009). Además, como ya se mencionó con anterioridad, la presencia de la TSST en cepas CC30 ha sido observada en otros estudios (Deurenberg et al., 2009b). Muestra de la gran capacidad de expansión del CC30 es la identificación de un nuevo ST perteneciente a este CC y la presencia, en la actualidad, de más de 100 STs adscritos actualmente a él. Si a este hecho le unimos su capacidad para producir TSST parece evidente la necesidad de conocer más sobre cepas pertenecientes a esta variante genética.

Continuando con el análisis de los factores de virulencia detectados, dos cepas de este estudio contenían el gen *eta* el cual codifica la toxina exfoliativa A. Estas cepas pertenecieron a los CCs 121 y 109. Se ha observado que existe una subclase de cepas de *S. aureus* CC121 capaces de producir las toxinas exfoliativas A y B causando el conocido como síndrome de piel escaldada e impétigo (Masiuk et al., 2010). La mayoría de las cepas portaban los genes de hemolisinas *hla* y *hld* y muchas de ellas también los genes *hlb*, *hlg* y *hlg-2*, toxinas producidas por la mayor parte de cepas de *S. aureus* (Dinges et al., 2000).

En cuanto a los genes de enterotoxinas identificadas en 37 cepas (69,8%) se detectó al menos uno de ellas. Así, los genes encontrados más comúnmente (en el 60,4% de las cepas) fueron aquellos que forman parte del operón *egc*. La presencia de sólo algunos genes del operón *egc*, observada en este estudio, había sido ya descrita con anterioridad (Smyth et al., 2005; Blaiotta et al., 2006). Se ha observado que existe una asociación entre algunas líneas genéticas y algunos genes codificantes de enterotoxinas (Holtfreter et al., 2007). Con ello, es destacable que la mayor parte de las cepas CC30 contenían el operón *egc*, con o sin el gen *seo*. Se detectaron los genes *sec* y *sel*, los cuales están localizados en una isla de patogenicidad estafilocócica, en dos cepas pertenecientes al CC45 y CC97. Se ha observado que podría haber una relación entre el linaje clonal CC45 y esta isla de patogenicidad (Holtfreter et al., 2007). En dos cepas CC5 se encontraron los genes *sed*, *sej* y *ser* los cuales se han encontrado formando parte de un plásmido (pIB485) (Omoe et al., 2003). Por otro lado, aunque el gen *sea* se ha asociado por otros autores con una especificidad más amplia apareciendo en cepas de diferentes CCs (Holtfreter et al., 2007), en nuestro caso todas las cepas que lo contenían fueron CC30. Es importante destacar que el gen *seh*, el cual se ha descrito formando parte de casetes cromosómicos estafilocócicos fue identificado en tres cepas SASM

(Noto et al., 2006). Una de nuestras cepas perteneció al CC1-t127 y presentó los genes *sea*, *sek* y *seq*, los cuales se localizan en el mismo fago, y el gen *seh*. Sin embargo, el CC1 que, como se mencionó anteriormente, se asocia principalmente a cepas comunitarias, suele presentar los genes *sea*, *sec*, *seh* y *sek* (Shukla et al., 2010). Finalmente, no se detectaron los genes *etb* y *etd* en ninguna de nuestras cepas. Esto era de esperar si consideramos que la prevalencia de las toxinas exfoliativas B y D en *S. aureus* es muy baja (Becker et al., 2003).

Con todo lo expuesto podemos concluir que el conocimiento de las líneas genéticas circulantes en la población sana y de sus determinantes de virulencia y de resistencia, es de gran interés para comprender mejor la evolución de este microorganismo.

Caracterización de cepas SARM de origen hospitalario

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre cepas SARM aisladas en el mismo hospital en dos periodos separados entre sí por 8 años de diferencia con la finalidad de conocer la evolución de las líneas genéticas en el tiempo. La prevalencia de SARM en los dos periodos estudiados fue similar (27-29%). Si observamos los datos obtenidos en otros estudios llevados a cabo en nuestro país, vemos que desde el año 1986 (1,5%) hasta el 2002 (31,2%) se produjo un aumento progresivo de SARM (Cuevas et al., 2004) que pareció estabilizarse en el año 2006 (30%) (Cuevas et al., 2008). En Europa, según los últimos datos de la EARSS, en siete países (Austria, Chipre, Estonia, Francia, Grecia, Irlanda y Reino Unido) ha ido disminuyendo la tasa de SARM invasivo. Sin embargo, en cuatro países (Italia, Hungría, Alemania y Eslovenia) esta tasa ha aumentado. En cualquier caso, en una cuarta parte de los países europeos (entre ellos España) siguen apareciendo porcentajes de SARM invasivo superiores al 25% lo cual es de suma importancia y preocupación (EARSS, 2010).

En los países europeos, los tipos de *spa* detectados en cepas SARM, en contraste con lo que ocurre con cepas SASM, suelen presentar una distribución regional (Grundmann et al., 2010). Así en nuestro trabajo, el tipo de *spa* t067 fue el más frecuente en las cepas de ambos años. Este tipo de *spa* es el más común en cepas clínicas en nuestro país (Pérez-Vázquez et al., 2009) y, recientemente, se ha comprobado que también parece ser común en Finlandia (Vainio et al., 2011). No

obstante, la frecuencia de detección de estas cepas en otros países como Francia, Noruega, Dinamarca, Suecia, Alemania, EEUU o en países de Sur América, es muy baja (Fossum et al., 2006; Grundmann et al., 2010; <http://spa.ridom.de/spa-t067.shtml>). El tipo de *spa* t067 suele asociarse con cepas SARM CC5 (generalmente ST125 y en algunos casos ST5), con el tipo de SCC*mec* IV y el tipo de *agr* II. Los subtipos de SCC*mec* IV suelen ser IVa y IVc, los cuales se han identificado en porcentajes distintos según los diferentes estudios (Argudín et al., 2009; Pérez-Vázquez et al., 2009). En este trabajo, se identificó el tipo IVc en todas las cepas SARM CC5-t067.

Además, se ha establecido una relación entre SARM CC5-t067 y la resistencia a ciprofloxacina, tobramicina y eritromicina. Este perfil de resistencia suele deberse, en estas cepas, a la presencia de los genes *ant*(4')-Ia y *msr*(A)/*msr*(B) (Pérez-Vázquez et al., 2009). La mayor parte de nuestras cepas fueron resistentes a tobramicina y contenían el gen *ant*(4')-Ia y algunas de ellas fueron resistentes a eritromicina y portaban los genes *msr*(A)/*msr*(B). No obstante, debemos señalar que el gen *ant*(4')-Ia se identificó también en muchas de las cepas SARM no-CC5-t067.

Otro tipo de *spa* (t002), también asociado al CC5, se detectó sólo en cepas del 2009. Este tipo de *spa* ya había sido hallado en otros estudios llevados a cabo en hospitales de nuestro país (Argudín et al., 2009; Pérez-Vázquez et al., 2009; Vindel et al., 2009). Es destacable que una de estas cepas presentó una nueva variante del SCC*mec* IVNv la cual había sido descrita previamente en cepas con ese mismo tipo de *spa* en Argentina (Sola et al., 2012).

Otro dato de gran interés es la emergencia de cepas SARM CC8 en el 2009 con respecto al 2001. Mientras en el 2001 sólo se encontró una cepa perteneciente a este CC (1%), en el 2009 el 22% de las cepas presentaron tipos de *spa* asociados a esta variante genética. El clon SARM-AC CC8 (conocido como USA300) se identificó por primera vez en EEUU y desde entonces se ha ido diseminado a varios países europeos, Canadá, Sur América y Asia (Vandenesch et al., 2003; Deurenberg et al., 2008). Si analizamos las cepas CC8 detectadas en nuestro trabajo, vemos que la mayoría de ellas fueron aisladas de muestras de heridas lo que concuerda con que SARM-AC normalmente causa infecciones de piel y partes blandas. Así, el aumento de cepas SARM-AC y la sustitución por parte de estas cepas de clones SARM-AH, se ha observado anteriormente por otros autores (David et al., 2010). Además, se ha comprobado como en muchos casos las diferencias entre SARM-AC y SARM-AH, son cada vez menores

(David et al., 2010). Esto se corrobora por el hecho de que muchas de nuestras cepas SARM CC8 fueron resistentes, a parte de β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, mupirocina, macrólidos y lincosamidas. Sólo dos de las cepas CC8 contenían los genes codificantes de la LPV. Estas cepas mostraron características que están altamente en consonancia con las inicialmente propuestas para SARM-AC. Además, estas cepas fueron aisladas a partir de infecciones cutáneas, su tipo de *SCCmec* fue IVa, pertenecieron al CC8 con los tipos de *spa* t008 y t024 y una de ellas fue sólo resistente a β -lactámicos y la otra a β -lactámicos y tetraciclina.

Es destacable, también, que algunas de las cepas CC5 y CC8 aisladas durante el año 2009 (12%) presentaron resistencia a mupirocina. La emergencia de cepas resistentes a mupirocina se ha descrito con anterioridad en otros hospitales (Rossney et al., 2008) y podría deberse al uso de este agente para la descolonización de portadores nasales de SARM.

Además de los complejos clonales CC5 y CC8, se hallaron otros complejos (CC22, CC30, CC228 y CC247) pero en un bajo porcentaje, al igual que en otros estudios llevados a cabo en España (Argudín et al., 2009; Pérez-Roth et al., 2004; Pérez-Vázquez et al., 2009; Vindel et al., 2009). El CC22, conocido como clon Británico (EMRSA-15), se describió en nuestro país en 1999 y siempre ha aparecido en un porcentaje muy bajo de cepas (<2%) (Pérez-Roth et al., 2004). En cuanto a las cepas SARM CC30 (EMRSA-16) conviene destacar que aunque se han asociado normalmente con tipos de *SCCmec* II y IV (Pérez-Vázquez et al., 2009; Vindel et al., 2009), la cepa detectada en nuestro hospital presentó el tipo III. Existe una descripción anterior del *SCCmec* III en cepas CC30 y en ellas se asoció a la presencia del transposón Tn6072 (Chen et al., 2010). En cuanto al CC228 (clon del Sur de Alemania) decir que, junto al CC5, es uno de los clones de SARM-AH diseminados más amplimente a lo largo del mundo (Deurenberg et al., 2008). Las dos cepas SARM CC247 de nuestro trabajo fueron las únicas resistentes a tetraciclina del 2001 y corresponden con el llamado clon Ibérico. Este clon fue el encontrado más frecuentemente durante los años 90 en España pero su prevalencia disminuyó en los años posteriores siendo sustituido por el clon derivado del Pediátrico (CC5-t067) (Gasch et al., 2011; Pérez-Roth et al., 2004). Por ello, no es de extrañar, que cepas SARM CC247 se identificasen únicamente en el periodo estudiado del 2001 y no en del 2009.

En cuanto a los determinantes de virulencia detectados, el gen *tst* se observó sólo en cuatro cepas del 2001: tres cepas SARM CC5-t067 y la única cepa de SARM CC30-t012. Se han descrito en otros estudios cepas CC5-t067 portadoras de este gen de virulencia (Argudín et al., 2009) e incluso se ha hablado recientemente en Francia de un clon CC5 positivo para *tst* (Robert et al., 2011). Por otro lado, como ya se comentó con anterioridad en esta tesis, existe una asociación entre el CC30 y la TSST (Deurenberg et al., 2009b).

Al igual que ocurrió con muchas de las cepas del estudio de portadores, se detectó que existía una asociación entre los genes codificantes de enterotoxinas detectados y los CCs. De esta forma, el elemento *egc* se identificó en cepas pertenecientes a los CC5, CC22, CC30 y CC228. Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores donde el operón *egc* aparece frecuentemente en cepas CC5, CC22 y CC30, pero no en cepas CC8 (Holtfreter et al., 2007). Además, en 15 cepas SARM CC8 (tipos de *spa* t008 y t2849) y en dos cepas CC5-t002, se obtuvieron resultados positivos para las PCRs de los genes *sed*, *sej* y *ser*, los cuales se localizan en el plásmido pIB485 (Omoe et al., 2003). La presencia de estos genes en cepas CC5 y CC8 se ha descrito con anterioridad (Monecke et al., 2011) e incluso se ha sugerido una fuerte asociación con el CC8 (Holtfreter et al., 2007). Otros genes codificantes de enterotoxinas detectados fueron los genes *sea* y *sep*, los cuales se movilizan gracias a bacteriófagos (Baba et al., 2002; Chiang et al., 2008). El gen *sea* se encontró principalmente en cepas CC8, CC228 y CC247 y el gen *sep* en cepas CC5 (y en una cepa CC8). En otros estudios ya se había establecido que el gen *sea* presentaba una amplia distribución detectándose en cepas de varios CCs (Holtfreter et al., 2007) y, en el caso del gen *sep*, se cree que aparece normalmente en cepas SARM con *agr* tipo II (Argudín et al., 2009).

Una vez conocido el tipo y la evolución temporal de líneas genéticas de SARM en un hospital en el que no se detectaron cepas pertenecientes a la variante CC398, y sabiendo que las cepas SARM de este linaje son casi siempre resistentes a tetraciclina, quisimos evaluar la prevalencia de CC398 en cepas SARM-TET^R. De esta manera, podríamos confirmar si la resistencia a tetraciclina era realmente un buen marcador para detectar cepas CC398.

Para ello se estudiaron todas las cepas SARM-TET^R (52 cepas) obtenidas en un hospital (Miguel Servet de Zaragoza) en dos años consecutivos (2009-2010) lo que

representó el 8,2% de las cepas SARM aisladas en ese periodo. Según los tipos de *spa* detectados, las cepas SARM-TET^R aisladas en dicho hospital pertenecieron a los CCs: CC398 (67,3% de las cepas), CC1 (11,5%), CC5 (11,5) y CC8 (9,6%). Dado el alto porcentaje de SARM CC398 obtenido entre las cepas resistentes a tetraciclina parece que esta variante genética está emergiendo en nuestros hospitales. No obstante, este elevado porcentaje de SARM CC398 se explicaría, en parte, por el hecho de que el hospital analizado se halla en una región en la que existe una elevada densidad de granjas de cerdos. Por otro lado, destaca que se identificaron tres tipos de *spa* nuevos relacionados con el CC398. Hasta el momento existen más de 25 tipos de *spa* descritos en cepas CC398 lo que, según algunos autores, sugiere que el elemento SCC_{mec} se ha introducido en múltiples ocasiones (Graveland et al., 2011a).

Aunque SARM CC398 es, en general, poco virulento si lo comparamos con otros CCs (Lewis et al., 2008; Witte et al., 2007), el fenotipo de multirresistencia que suelen presentar limita mucho las opciones terapéuticas. De esta forma, la mayoría de las cepas SARM CC398 analizadas en este trabajo presentaron resistencia, a parte de a β -lactámicos y tetraciclina, a macrólidos, lincosamidas y quinolonas y en algunas de ellas se observó también resistencia a aminoglucósidos.

Por otro lado, el 11,5% de las cepas pertenecieron al CC1. Este CC lo hemos ya identificado en esta tesis en el primer caso clínico y en una cepa de portadores sanos. Como ocurrió en las cepas SARM CC1 del primer caso clínico, las cepas aisladas en el Hospital Universitario Miguel Servet mostraron fenotipos de multirresistencia. Respecto al otro tipo de *spa* hallado en una cepa CC1 (t1381) se ha identificado previamente asociado a otro CC, el CC12 (Argudín et al., 2009).

Se identificaron tres cepas LPV positivas en este estudio, todas ellas pertenecientes al CC8 con dos tipos de *spa*, t008 (dos cepas) y t7613 (una cepa). Dentro del CC8 existen diferentes clones algunos de los cuales se asocian a la producción de esta toxina (USA300) y otros no (Lyon Clone, USA500, UK12 o UK16) (Deurenberg et al., 2008). La cepa positiva para LPV y con el nuevo tipo de *spa* t7613, perteneció a la ST94. Se trata de la primera descripción de una cepa SARM ST94 portadora de los genes *lukF-PV/lukS-PV*.

En este estudio se analizó, además, la presencia del factor de virulencia *cna* y se vio que todas las cepas positivas pertenecían a los complejos CC398 y CC1. El gen

ena codifica una proteína de adhesión a colágeno que favorece la adherencia de la cepa a los tejidos del hospedador (Zetola et al., 2005). Esta toxina ha sido identificada también por otros autores en cepas CC398 y CC1 (Feßler et al., 2010; Otsuka et al., 2006).

Gracias a los resultados obtenidos del análisis de cepas SARM resistentes a tetraciclina en un hospital español, podemos decir que la resistencia a este antibiótico podría ser un buen marcador inicial para la detección de esta variante genética. No obstante, hay que tener en cuenta que este fenotipo podría ser detectado en cepas de otros CCs.

Mecanismos de resistencia inusuales en cepas SARM CC398 y otras cepas de *Staphylococcus* spp.

En las 21 cepas seleccionadas por presentar el fenotipo disociado de sensibilidad a macrólidos y resistencia a lincosamidas se identificaron los genes de resistencia *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)*, *vga(A)*-variante y *cfr*. Once de las 14 cepas positivas para los genes *lnu(A)*, *lnu(B)* y *vga(A)* pertenecieron a líneas genéticas asociadas a ganado o fueron obtenidas a partir de muestras de origen animal: a) 7 cepas SARM CC398; b) 2 cepas SASM CC9; c) una cepa SCRm aislada de cerdo; d) una cepa SERM ST60 aislada de gato. Tanto CC398 como CC9 son variantes genéticas asociadas a animales (Neela et al., 2009; Voss et al., 2005; Wagenaar et al., 2009). CC9 es la variante de SARM-AG que se encuentra frecuentemente en países asiáticos pero se han identificado también cepas CC9 en animales de granja que, como en nuestro caso, son sensibles a meticilina (Bagcigil et al., 2007). Además, la cepa de SCRm portadora del gen *lnu(A)* fue obtenida a partir de una muestra nasal de cerdo y la cepa SERM ST60 de una muestra nasal de gato. Según estos datos parece claro que existe una relación entre los genes que proporcionan resistencia a lincosamidas y cepas de estafilococos de origen animal. De hecho, genes responsables de este fenotipo inusual han sido identificados en cepas pertenecientes a la línea genética CC398 con anterioridad. Este es el caso de los genes codificantes de bombas de eflujo *vga(A)*, *vga(C)* y *vga(E)*, habiéndose descrito estos dos últimos originariamente en cepas CC398 (Kadlec et al., 2010a; Kadlec et al., 2010c; Schwendener et al., 2011, Hauschild et al., 2012). Además, en un estudio llevado a cabo en cepas SCN de origen animal se identificaron nueve plásmidos nuevos portadores del gen *lnu(A)* (Lüthje et al., 2007). La presencia de estos

genes en cepas de origen animal puede explicarse por la adaptación de este microorganismo a la presión sufrida por el uso de algunos antimicrobianos en veterinaria. Los genes *lnu(A)* y *lnu(B)* confieren resistencia a lincosamidas y este grupo de antimicrobianos se utiliza ampliamente en el tratamiento de infecciones en animales (OIE, 2007). El uso tanto de lincomicina como de sus derivados semisintéticos, clindamicina y pirlimicina, está aprobado en veterinaria en la UE (www.ema.europa.eu). De hecho, los antibióticos lincomicina y pirlimicina, se utilizan principalmente para el tratamiento de la mastitis bovina subclínica por medio de infusión intramamaria (Lüthje et al., 2006). Por otro lado, los genes *vga* confieren resistencia, además de a lincosamidas, a estreptograminas A y pleuromutilinas. Esta última clase incluye antibióticos utilizados en medicina humana como la repamulina (para uso tópico) pero también incluye a valnemulina y tiamulina los cuales se utilizan frecuentemente en veterinaria (Jones et al., 2006). De esta manera, la utilización de pleuromutilinas en animales ayuda a seleccionar cepas que presentan el fenotipo inusual estudiado en este trabajo.

No obstante, algunos de los genes de resistencia a lincosamidas hallados en este estudio también se identificaron en cepas de origen humano. La cepa restante que portaba el gen *lnu(A)* fue una cepa de SARM del linaje CC5-t067 que, como hemos visto, es el más comúnmente encontrado en nuestros hospitales (Pérez-Vázquez et al., 2009). El gen *vga(A)* se identificó en cepas de *S. epidermidis* y este microorganismo se asocia principalmente a infecciones en humanos. Sin embargo, es cierto que también se han aislado cepas de *S. epidermidis* en animales de compañía (Malik et al., 2006) o como agente infeccioso en caballos (Trostle et al., 2001). En nuestro estudio una de las cepas de *S. epidermidis* perteneciente a la ST60 fue aislada a partir de una muestra nasal de gato. Por otro lado, una variante del gen *vga(A)* se detectó en nuestro estudio en cuatro cepas SARM CC8. Este CC se asocia principalmente a cepas SARM-AC y se describió por primera vez en EEUU (clon USA300) (Deurenberg et al., 2008). En la actualidad se ha encontrado también en Europa y aunque se relaciona normalmente a un origen humano se ha sugerido que presenta facilidad para adaptarse al ganado equino (Cuny et al., 2010).

Los valores de CMI obtenidos en las cepas portadoras del gen *lnu(A)* están en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores (Lüthje et al., 2007). Sólo el valor de CMI de lincomicina se vió incrementado en las cepas transformantes en comparación con la cepa receptora. El gen *lnu(A)* codifica una nucleotidiltransferasa que

modifica a la lincomicina, pirlimicina y clindamicina. Sin embargo, este gen no confiere resistencia a clindamicina aunque sí que se ha observado una alteración en la actividad de este antibiótico (Brisson-Noël et al., 1988). Se detectaron valores de CMI elevados a otros antibióticos en las cepas C4128 y C2376. En la primera cepa este hecho se podría explicar por la presencia del gen *vga(A)* y por el efecto aditivo de ambos genes al estar presentes en la misma cepa. En cepas portadoras del gen *vga(A)_{LC}* y de los genes *lnu(A)* o *erm(C)* ya se observó un efecto similar (Novotna et al., 2006). No obstante, en la cepa C2376 no se detectó otro gen de resistencia que pudiese explicar los valores de CMI obtenidos, pero parece bastante seguro que debe haber otro mecanismo sin identificar. Los valores de CMI hallados en las cepas positivas para *lnu(B)* fueron más elevados que los de las cepas positivas para *lnu(A)*. Así las tres cepas C2828, C2829 y C2944 presentaron altos valores de CMI de lincosamidas y pleuromutilinas y en menor medida de estreptograminas A. Esto puede explicarse por dos razones. Así, mientras la proteína Lnu(A) modifica un grupo hidroxilo de la clindamicina y la lincomicina en las posiciones 3 y 4 respectivamente, la proteína Lnu(B) modifica la posición 3 en ambos antibióticos (Morar et al., 2009). Además, en la región aguas arriba del gen *lnu(B)* se identificó un gen que codifica una proteína de transporte ABC que muestra una semejanza del 76,5% con la proteína estafilocócica Lsa(B) (Kehrenberg et al., 2004). En cuanto a las cepas transformantes del gen *vga(A)*, como era de esperar, además de aumentar el valor de CMI de lincomicina se aumentaron los valores de clindamicina, virginiamicina y tiamulina. No obstante, las cepas portadoras del gen *vga(A)*-variante mostraron un nivel menor de resistencia a clindamicina, lincomicina y tiamulina que el gen *vga(A)*. Esto ya se había observado en estudios anteriores (Gentry et al., 2008).

Hasta el momento se han identificado 15 plásmidos diferentes que contienen al gen *lnu(A)* y que presentan un tamaño desde 2278 hasta 14173 pb (Loeza-Lara et al., 2004; Lüthje et al., 2007, Rosander et al., 2008). Normalmente, los plásmidos que contienen este gen suelen ser de pequeño tamaño y replican según el mecanismo del círculo rodante (Loeza-Lara et al., 2004; Lüthje et al., 2007). Nosotros hemos identificado un plásmido nuevo (pUR5425) con un tamaño de 2690 pb y que contiene un gen *rep*, un origen de replicación de cadena sencilla (*ssrA*) y un origen de replicación de doble cadena (*dso*). Si comparamos las proteínas Lnu(A) codificadas por los genes de los dos plásmidos detectados en este estudio (pLNU1 y pUR5425), observamos algunos cambios aminoacídicos. Estas diferencias habían sido ya

observadas previamente (Lüthje et al., 2007) e incluso, inicialmente, se propusieron dos variantes de este gen [*lnu(A)* y *lnu(A)'*] (Brisson-Noël et al., 1988).

No existen muchos datos sobre la localización y el entorno genético del gen *lnu(B)*. En su primera descripción, se sugirió que este gen se localizaba en un plásmido de gran tamaño (sobre 240 kb), que podía intercalarse en el cromosoma según los resultados de los experimentos de conjugación que se llevaron a cabo (Bozdogan et al., 1999). Estos resultados podrían explicar las distintas localizaciones de este gen en nuestras cepas. Así, en la cepa C2944 este gen se detectó en un plásmido de tamaño muy similar al encontrado en ese estudio (250 kb) y en las cepas C2828 y C2829 se halló en el cromosoma. Si consideramos la información sobre este gen disponible en el GenBank vemos que sólo existe el entorno de una de las cepas portadoras del *lnu(B)* descritas. Este entorno consiste en parte de la secuencia del plásmido pEF418 de *E. faecalis* (AF408195.1). En nuestro estudio se detectó una nueva estructura genética que fue similar en las tres cepas. La región inmediatamente anterior al gen *lnu(B)* contenía genes de resistencia a aminoglucósidos, como el gen *aadE* (resistencia a estreptomicina) o *spc* (resistencia a espectinomicina). Esto concuerda con el hecho de que las tres cepas *lnu(B)* positivas fueron resistentes a aminoglucósidos. Además, se identificaron dos secuencias de inserción iguales (IS257) que flanqueaban toda la estructura y se observó por PCR que intermedios circulares de la región completa eran capaces de formarse. Este hallazgo indica que la transferencia lateral de este gen podría ocurrir gracias a la presencia de esas dos ISs. Se deberían llevar a cabo estudios posteriores para confirmar este aspecto.

Por otro lado, el gen *vga(A)* se ha descrito normalmente en pequeños plásmidos movilizables (Gentry et al., 2008; Kadlec et al., 2010a) que aprovechan la maquinaria presente en otros plásmidos para poder transferirse de una bacteria a otra. En este estudio se identificaron cuatro plásmidos nuevos. Dos de ellos, el pUR2355 y el pUR4128 fueron muy similares entre sí, y lo mismo ocurrió con los otros dos plásmidos, pUR3036 y pUR3937, los cuales fueron también muy parecidos entre sí. En el caso de estos dos últimos plásmidos, destaca que fueron identificados en cepas de *S. epidermidis* y que se asemejaban a otro plásmido ya descrito con anterioridad (pSE-12228-06) en una cepa de esta misma especie (Zhang et al., 2003). Según estos resultados parece que estos plásmidos podrían tener preferencia por este microorganismo. El plásmido pSE-12228-06 contenía el gen *tagG* el cual codifica una proteína permeasa relacionada con la translocación del ácido teicoico. En nuestros dos

plásmidos nuevos no se hallaron el gen *tagG* y en su lugar se encontró el gen *vga(A)*. Algo similar se detectó en el plásmido pACK4 el cual resultó ser idéntico al plásmido pVGA pero sin el gen *vga(A)* (Gargis et al., 2009). Parece bastante evidente que existe un origen común a estos plásmidos que explicaría estas similitudes estructurales. Por otro lado, en dos de nuestros cuatro plásmidos nuevos (pUR4128 y pUR3937) la proteína Vga(A) fue similar a la codificada por el plásmido pVGA. Sin embargo, se detectaron pequeñas variaciones con las proteínas Vga(A) codificadas en los dos plásmidos nuevos (pUR2355 y pUR3036). Esto está en consonancia con otros estudios en los cuales también se han detectado cambios aminoacídicos en esta proteína (Mendes et al., 2011).

De las cuatro cepas SARM CC8 se eligió una de ellas para estudiar el mecanismo de resistencia asociado a lincosamidas. Se detectó, en esta cepa (C3898), una variante del gen *vga(A)* que ya había sido descrita anteriormente (Haroche et al., 2000). Al analizar su entorno genético se vio que formaba parte del transposón conocido como Tn5406 pero que en la proteína TnpC existían dos cambios aminoacídicos con respecto a la original. Este transposón ya había sido descrito en una cepa clínica de *S. aureus* y es muy similar al Tn554 el cual contiene al gen *erm(A)* (Haroche et al., 2002). De la misma manera que el Tn554 y otros transposones identificados en estafilococos como Tn558, Tn559 o Tn6133, el Tn5406 se integra de manera preferente en el gen cromosómico *radC*. Además, se cree que la presencia de múltiples copias de este gen afectan al nivel de resistencia que confieren (Gentry et al., 2008). Así, en nuestro trabajo, se evidenció por hibridación la presencia de múltiples copias del gen a nivel cromosómico. No obstante, aunque otros transposones de la familia Tn554 también se han identificado en plásmidos (Kehrenberg et al., 2005b), en nuestro caso, no se obtuvieron resultados positivos en la hibridación de la membrana obtenida a partir del gel S1-PFGE.

Nuestros resultados evidencian una clara transferencia de genes de resistencia y plásmidos entre diferentes especies y géneros bacterianos y entre cepas de origen humano y origen animal. Así, el plásmido pLNU1 el cual contiene el gen *lnu(A)*, descrito por primera vez en una cepa de *S. chromogenes* (Lüthje et al., 2007), se detectó en nuestro trabajo en otras dos especies de estafilococos (*S. aureus* y *S. sciuri*). Este resultado era de esperar si tenemos en cuenta que hasta el momento, ya se ha detectado el gen *lnu(A)* en las especies *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. chromogenes*,

S. simulans, *S. haemolyticus*, y *S. epidermidis* (Loeza-Lara et al., 2004; Lüthje et al., 2007; Perreten et al., 2010).

El gen *lnu(B)* se detectó en este trabajo en tres cepas de *S. aureus* (dos SASM y una SARM). Este gen se describió por primera vez en una cepa clínica de *Enterococcus faecium* (Bozdogan et al., 1999) y posteriormente se ha detectado en cepas de *Streptococcus agalactiae* (de Azavedo et al., 2001), *Streptococcus uberis* (Schmitt-van de Leemput et al., 2007) y *Clostridium* spp. (Martel et al., 2004). Con respecto a su detección en el género *Staphylococcus*, aunque no existe información sobre ello en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), en la página web <http://faculty.washington.edu/marilynr/> sí que aparece que el gen *lnu(B)* ha sido identificado en estafilococos. Nuestro estudio sería, por tanto, la primera descripción de este gen en SARM CC398.

El gen *vga(A)* se identificó en dos de las cepas SARM CC398 de este estudio, formando parte del plásmido pVGA. Este plásmido se describió por primera vez en una cepa de *S. aureus* aislada de una muestra clínica de origen humano (Gentry et al., 2008). No obstante, su estructura es muy similar a la del plásmido pCPS32, el cual se detectó con posterioridad en una cepa de SARM CC398 de origen porcino (Kadlec et al., 2010a). Además, recientemente, se ha identificado la transferencia de otro plásmido de mayor tamaño (24 kb) y portador también del gen *vga(A)* entre cepas aisladas a partir de los cerdos y del trabajador de una granja en EEUU (Mendes et al., 2011). En nuestro estudio, cabe destacar que uno de los plásmidos nuevos, el pUR2355, se encontró en dos cepas de estafilococos de distinta especie (una de SARM y otra de SESM) pero que fueron aisladas de cepas de un mismo entorno familiar. De esta forma, la cepa de SARM C2355 fue una de las cepas clínicas obtenidas en el caso clínico número siete estudiado en esta tesis. La otra cepa fue una cepa de SESM que se obtuvo a partir de la muestra nasal del hijo del paciente de ese mismo caso. Es probable que este plásmido se transfiriera de una cepa a otra de distinta especie por hallarse en el mismo ambiente. La capacidad de este plásmido para encontrarse en diferentes hospedadores se podría deber a la presencia de dos genes *rep* diferentes en el mismo plásmido. De hecho, mientras una de las proteínas Rep presentó una gran similitud a otras encontradas en plásmidos de *S. aureus* (98%, NP_048339.1; 97%, NP_048341.1), la otra proteína Rep fue idéntica a la de un plásmido de *S. hominis* (100%, ZP_04060075.1) y estuvo relacionada a otra encontrada en un plásmido de *S. epidermidis* (88%, EFV87934.1).

Por último, otro gen de resistencia a lincosamidas identificado en este trabajo fue el gen *cfr* el cual proporciona un fenotipo de multiresistencia que incluye también estreptograminas A, fenicoles, pleuromutilinas y oxazolidinonas (Kehrenberg et al., 2005a). En nuestro caso este gen se detectó en 3 cepas de *S. epidermidis* de un mismo paciente. Aunque se describió originariamente en una cepa de *S. sciuri* de origen bovino (Kehrenberg et al., 2005a) por el momento ya ha sido identificado tanto en cepas de origen animal como humano (Mendes et al., 2008; Mendes et al., 2010; Farrell et al., 2011; Bongiorno et al., 2010). En dos casos clínicos en los cuales el gen *cfr* fue detectado, las cepas pertenecían a las secuencias tipo ST2 y ST23 (Kehrenberg et al., 2007; Mendes et al., 2010), en lugar de ST22 que fue el linaje detectado en nuestras cepas. Por otro lado, en nuestro estudio, el gen *cfr* se localizó tanto en plásmidos como en cromosoma. Lo más habitual es que el gen *cfr* se halle en un plásmido. No obstante, ya se ha encontrado por algunos autores la presencia de este gen en cromosoma (Kehrenberg et al., 2007; Toh et al., 2007). De hecho, se ha observado que, cuando se halla en el cromosoma, las regiones que flanquean el gen indican un origen plasmídico (Toh et al., 2007). Destaca, además, que en el plásmido (pSCFS7) detectado en nuestras cepas, el gen *cfr* se encuentra junto al gen de resistencia *fexA* (Shore et al., 2010) En otros trabajos se ha observado que plásmidos que contienen al gen *cfr* llevan en muchas ocasiones otros genes de resistencia como el ya mencionado *fexA* o los genes *lsa(B)*, *tet(L)*, *ant(4')-Ia* o *dfrK* (Kehrenberg et al., 2007; Gopegui et al., 2012; Shore et al., 2010). Adicionalmente, nuestras cepas también mostraron una mutación en el ARNr 23S (C2534) y cambios aminoácidos e inserciones en las proteínas ribosómicas L3 y L4 lo que contribuiría a aumentar la resistencia a linezolid. Sin embargo, probablemente, el principal mecanismo de resistencia a linezolid en estas cepas sea el gen *cfr* ya que una elevada CMI de este antibiótico fue obtenida en la cepa transconjugante. Además, se ha descrito con anterioridad que, cepas que presentan la mutación C2534 en el ARNr 23S, muestran valores de CMI de 8-10 mg/L (Liakopoulos et al., 2010). En cuanto a las modificaciones en L3 y L4, en general, se puede decir que suelen conferir bajos niveles de resistencia (Mendes et al., 2010). Además de todo esto, se ha observado que, seguramente, la presencia del gen *fexA* en el mismo plásmido tiene un efecto aditivo en la resistencia a fenicoles (Kehrenberg et al., 2006). Por lo tanto, a la importante implicación clínica que ya es la presencia del gen *cfr* el cual produce resistencia simultánea a multitud de antibióticos, hay que sumarle que en muchas ocasiones, se encuentra acompañado de otros mecanismos de resistencia que agravan esta situación.

Tipado y caracterización de plásmidos en cepas de *S. aureus*

Optimización del sistema de clasificación y características de las familias rep

Debido a la falta de un sistema específico para la clasificación de plásmidos de *S. aureus* se llevó a cabo, en este trabajo, la ampliación de un sistema previamente desarrollado para plásmidos de bacterias Gram positivas (Jensen et al., 2010). Gracias al estudio de los genes *rep* de plásmidos de *S. aureus* se pudo diseñar un método el cual incluía 15 familias *rep* y 10 SUs. A continuación se describen las características más relevantes de cada una de las familias *rep* y de los plásmidos adscritos:

La familia *rep*₁ se describió en el estudio anterior (Jensen et al., 2010) y sólo un plásmido pIP680 de *S. aureus* formaba parte de ella. Este plásmido contiene tres genes de resistencia a estreptograminas (*vat*, *vga*, *vgb*) tratándose seguramente de la cointegración de dos plásmidos, uno descrito en el género *Enterococcus* y el otro un plásmido portador del gen *vga* identificado en *Staphylococcus* (Allignet et al., 1999).

La familia *rep*₅ estuvo compuesta por ocho plásmidos de *S. aureus*. La mayor parte de estos plásmidos se identificaron en cepas clínicas y pertenecieron al grupo de beta-lactamasas y resistencia a metales pesados (Fischetti et al., 2006), este es el caso de los plásmidos pSAS, pN315, pMW2, pWBG752 y SAP047A. Los plásmidos pRJ6 y pRJ9 son plásmidos mobilizables (Varella et al., 2009) y el plásmido pJE1 porta determinantes de resistencia a antisépticos, desinfectantes, aminoglucósidos y trimetoprim (Berg et al., 1998).

La familia *rep*₇ estuvo formada por 20 plásmidos de *S. aureus*, un casete de resistencia a metilicina de esta misma especie y ocho plásmidos de otros géneros y especies. Se trata, por tanto, de una familia con un amplio rango de hospedadores en la cual varios plásmidos portaban genes de resistencia a antibióticos. Algunos de los miembros de esta familia podrían incluirse en la clase I de la familia pT181 según la clasificación de Novick (Novick, 1989). Dos de los plásmidos (pS0385-1 y pS0385-2) de la familia *rep*₇ fueron identificados en una cepa de SARM CC398 aislada a partir de un caso de endocarditis (Schijffelen et al., 2010) y otro (pUSA300) a partir de una cepa de SARM USA300 (Diep et al., 2006).

La familia *rep*_{7b} estuvo compuesta por tres plásmidos de *S. aureus*. Los plásmidos pC223 y SAP089A los cuales contenían el gen *cat* de resistencia a cloranfenicol (Smith et al., 2004) y el plásmido pVGA que portaba el gen *vga*(A) de resistencia a lincosamidas, pleuromutilinas y estreptograminas A (Gentry et al., 2008).

Otra familia con un amplio rango de hospedadores fue la *rep*₁₀ ya que estuvo formada por cuatro plásmidos de *S. aureus* y cuatro plásmidos de otros géneros y/o especies. Dos de los cuatro plásmidos de *S. aureus* contenían el gen *erm*(C) y los plásmidos pDLK1 y pSN2 formaban parte de la clase I según la clasificación de Novick (Novick, 1989).

La familia *rep*_{10b} englobó seis plásmidos altamente relacionados de *S. aureus*. Los plásmidos pSK6 and pSK3 fueron identificados en cepas multirresistentes, el plásmido pOX2000 en una cepa de SARM y los restantes tres plásmidos en cepas clínicas de origen humano. El plásmido pSK77, además, contenía genes de resistencia a antisépticos.

La familia *rep*₁₃ estuvo compuesta por seis plásmidos, cinco de *S. aureus* y uno de *S. saprophyticus*. Los plásmidos pC194, pKH13 y pMC524/MBM portaban el gen de resistencia *cat* (Bhakta et al., 2003) y los plásmidos pSK89 y pWBG1773 genes de resistencia a antisépticos y desinfectantes (Littlejohn et al., 1991).

La familia *rep*₁₅ englobó tres plásmidos de *S. aureus*. El plásmido conjugativo pSK41 que contiene genes de resistencia a antibióticos (Kwong et al., 2004), el plásmido pLW043 relacionado con la transferencia de la resistencia a vancomicina (Tn1546) a *S. aureus* (Weigel et al., 2003) y un plásmido (pUSA03) identificado en un clon de SARM comunitario (Diep et al., 2006).

La familia *rep*₁₆ estuvo formada por 11 plásmidos del grupo de beta-lactamasas y resistencia a metales pesados (Nakaminami et al., 2008; Massidda et al., 2006).

En la familia *rep*₁₉ hubo nueve plásmidos de *S. aureus* relacionados con la resistencia a metales pesados, en especial a cadmio y arsénico (O'Brian et al., 2002).

La familia *rep*₂₀ englobó 11 plásmidos del grupo de beta-lactamasas y resistencia a metales pesados. Entre estos plásmidos destaca el plásmido pTW20_1 el cual fue identificado en una cepa de SARM que resultó altamente transmisible y presentaba genes de resistencia a antibióticos y a antisépticos (Holden et al., 2010).

La familia *rep*₂₁ estuvo formada por 14 plásmidos algunos de ellos asociados a resistencia a metales pesados. Los plásmidos pSA1308 y pNVH01 contenían los genes *qacC* y *qacJ* respectivamente, los cuales proporcionaban resistencia a compuestos de amonio cuaternario (Bjorland et al., 2003). Dos plásmidos pertenecieron a la clase II de Novick, el plásmido pSK41 que confería resistencia a aminoglucósidos y antisépticos y el plásmido pGO1 que proporcionaba además resistencia a trimetoprim mediada por el gen *dfrS1* (Caryl et al., 2009). Los plásmidos pKH21 y pBMSa1 conferían resistencia a

lincomicina (Loeza-Lara et al., 2004) y el plásmido pS0385-3, es un pequeño plásmido críptico que fue identificado en una cepa de SARM CC398 (Schijffelen et al., 2010).

La familia *rep*₂₂ contenían dos plásmidos, el pKKS825 detectado en una cepa de SARM CC398 que portaba los genes de resistencia *ant*(4')-Ia, *tet*(L), *dfrK* y *vga*(C) (Kadlec et al., 2009c) y el pUB110 que confería resistencia a kanamicina y cuyo gen *rep* fue idéntico al de otros plásmidos detectados en SARM CC398 (pKKS627 y pKKS2187) (Kadlec et al., 2009b).

La familia *rep*₂₃ estuvo formada por dos plásmidos, ambos pertenecientes a la familia pSK41/pGO1 de plásmidos multirresistentes y ambos conferían resistencia de alto nivel a mupirocina (Pérez-Roth et al., 2010).

La familia *rep*₂₄ estuvo compuesta por dos plásmidos ambos detectados en cepas de Australia.

Si comparamos nuestro sistema de clasificación con otros sistemas previamente descritos vemos como existen algunas similitudes. Por ejemplo, algunas familias *rep* (*rep*₇ y *rep*₁₀) presentaron tamaños de plásmidos similares a los de los subgrupos pT181 and pSN2 de la clasificación de Novick (Novick, 1989). Además, los plásmidos pSAS y pMW2, los cuales se incluían en el mismo grupo según el sistema de Shearer, en nuestro estudio formaban parte de la misma familia *rep* (*rep*₅) (Shearer et al., 2011).

Diversidad de plásmidos en cepas de S. aureus de diferentes orígenes

En cuanto a las familias *rep* detectadas en las 92 cepas de *S. aureus* estudiadas, destaca la identificación de las familias *rep*₂, *rep*₆ y *rep*₉, aunque en un bajo porcentaje. La familia *rep*₆ ya se había hallado con anterioridad en cepas de enterococos y estreptococos, habiéndose observado ya en otros estudios la transferencia de plásmidos con un amplio rango de hospedadores (Grohmann et al., 2003). No obstante, las familias *rep*₂ y *rep*₉ sólo habían sido descritas en cepas de enterococos. Este hecho es una muestra más de transferencia genética entre diferentes microorganismos. Además, parece seguro que, conforme aumente el número de cepas en las cuales se estudie su contenido plasmídico, se observará que muchos de los plásmidos considerados inicialmente con un estrecho rango de hospedador son capaces de aparecer en cepas de distinta especie o género bacteriano.

En algunos casos se detectó una posible relación entre las líneas genéticas y las familias *rep* detectadas. De este modo, en nuestro estudio, los genes *rep* pertenecientes a las familias *rep*₇ y *rep*₂₁ (plásmidos pS0385-2 y pS0385-3) se detectaron en cepas

SARM CC398 y estos plásmidos habían sido previamente descritos en una cepa perteneciente a esta variante genética (Schijffelen et al., 2010). En cuanto al gen *rep* de la familia *rep*₂₀ (plásmido pTW20_1) se observó en una cepa humana de SARM CC8 y este plásmido fue identificado por primera vez en una cepa SARM de ese mismo CC (Holden et al., 2010). Resultados similares se han obtenido en otros estudios. Así patrones de plásmidos idénticos fueron detectados en cepas de enterococos pertenecientes al mismo linaje genético (Freitas et al., 2011). Adicionalmente, en otros estudios se observó que plásmidos previamente descritos en USA300 se detectaban exclusivamente en cepas pertenecientes a ese clon (Kuntová et al., 2012; Shearer et al., 2011). Sin embargo, otros genes *rep* parecen tener una mayor diseminación. Este es el caso de los plásmidos pKKS627 and pKKS825 (*rep*₂₂ and US) los cuales fueron descritos en cepas CC398 (Kadlec et al., 2009c) y sus genes *rep* se detectaron en este trabajo en cepas pertenecientes al CC398 pero también a los CCs, CC5, CC8, CC30. Este hecho sugiere la transferencia de EGMs y genes de resistencia entre diferentes líneas genéticas de *S. aureus*. Ya en otros estudios se vió la enorme expansión que tenían algunos plásmidos. Así, plásmidos pertenecientes a los grupos de pMW2 y pIB485 se hallaron en cepas aisladas a lo largo de varias décadas en tres continentes (Shearer et al., 2011). En nuestro trabajo no se pueden establecer diferencias considerando el origen geográfico (España o Dinamarca) de las cepas, debido a que la mayor parte de las cepas de ambos países pertenecían a la misma variante (CC398). Sin embargo, sí que se identificó que las mismas familias *rep* aparecían en cepas pertenecientes a orígenes y líneas genéticas diferentes.

Número y tamaño de los plásmidos portadores de los diferentes genes rep

En cuanto a los resultados obtenidos por S1-PFGE y por extracción de plásmidos, podemos observar un elevado número de plásmidos en las 18 cepas estudiadas. Por otro lado, no todos los plásmidos observados en cada una de las cepas pudieron ser tipados con el sistema de clasificación propuesto. Esto nos indica que existen muchos más plásmidos que los hasta ahora introducidos en el GenBank. Por lo tanto, conforme aumente el número de plásmidos secuenciados, se deberá actualizar el sistema de clasificación de los mismos.

En cuanto al tamaño de los plásmidos en los cuales se identificaron los diferentes genes *rep*, se observa que en algunas familias, como *rep*₅, *rep*₇, *rep*₂₀ o *rep*₂₂, el tamaño obtenido era muy diferente al esperado (según los datos del GenBank y de la bibliografía consultada). Además, en algunos casos, dos genes *rep* hibridaron en la misma banda, es decir, en el mismo tamaño de plásmido. Existen dos posibles

explicaciones, o bien la cepa contenía dos plásmidos diferentes del mismo tamaño o bien varios genes *rep* formaban parte del mismo plásmido. Esto último sería el resultado de la gran capacidad que tienen los plásmidos para variar su estructura, lo que se denomina plásmidos “mosaico” (Freitas et al., 2011). Sin embargo, el tamaño obtenido en otras familias *rep* (*rep*₁₀ y *rep*₂₁) las cuales contienen plásmidos de pequeño tamaño, fue el esperado. Por consiguiente, parece que aquellos plásmidos de menor tamaño permanecen más estables que los de mayor tamaño, en los cuales se han producido probablemente más cambios en su estructura.

Además, tras los experimentos de hibridación no se identificaron genes *rep* a nivel cromosómico a pesar de que no se consiguió determinar la localización de algunos de ellos. No obstante, en un estudio llevado a cabo en una cepa de *Acinetobacter baumannii* se observó que los genes *rep* podían integrarse en el cromosoma como resultado de la inestabilidad del plásmido (Towner et al., 2011).

En cuanto a la posible relación de genes de resistencia y familias *rep* se establecieron las siguientes asociaciones: *rep*_{7b} [*vga*(A)], *rep*₁₀ [*erm*(C)], *rep*₁₅ [*erm*(C)], *rep*₂₁ [*lnu*(A)] y *rep*₂₂ [*ant*(4')-Ia, *tet*(L) y *dfrK*]. Ya en el estudio anterior de Jensen se observó una combinación entre genes de resistencia y familias de plásmidos (Jensen et al., 2010). Aún así, el tamaño de los plásmidos identificados en nuestro estudio no fue en algunos casos el esperado, lo que podría hacernos pensar que en realidad son plásmidos mosaicos que han conservado algunos genes de resistencia.

Finalmente, como hemos observado a lo largo de esta tesis CC398 presenta en muchos casos un fenotipo de multirresistencia. La mayor parte de las cepas incluidas en el estudio de plásmidos pertenecieron al CC398 y poseían un elevado número de familias *rep* lo que indica la enorme habilidad de esta variante para captar plásmidos diferentes. Además, se ha indicado que cepas SARM poseen un contenido plasmídico mayor que cepas SASM (Coia et al., 1988), con lo que estos EGMs podrían haber tenido un papel indirecto en la evolución de SASM a SARM y en la emergencia de SARM.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se demuestra la transferencia animal-hombre de SARM CC398, siendo la actividad laboral directa con ganado porcino un factor de riesgo de colonización e infección, circunstancia a tener en cuenta en caso de ingresos hospitalarios. Asimismo se demuestra la posible transferencia entre personas colonizadas y/o infectadas por SARM CC398 en un mismo entorno familiar.
2. La descolonización nasal con mupirocina de individuos portadores de SARM CC398 presenta baja eficacia cuando existe contacto laboral directo y reiterado con animales colonizados.
3. Las cepas SARM CC398 se caracterizan por causar generalmente infecciones de piel y partes blandas (con excepciones) y presentar un alto contenido en genes de resistencia y bajo en genes de virulencia.
4. La prevalencia de SARM detectada en alimentos cárnicos es baja (1,6%), evidenciándose la presencia de líneas genéticas asociadas con animales (CC398) o con humanos (CC5 y CC217).
5. En individuos sanos se detecta una tasa de colonización nasal moderada por SARM (19%) y muy baja por SARM (0,4%), identificándose cepas SARM CC398 y CC97 en personas sin patrones de riesgo y sin contacto con animales. Estos datos podrían apoyar la hipótesis de que el posible origen de SARM CC398 de animales pudiesen ser cepas SARM CC398 de humanos.
6. Los estudios de SARM en el ámbito hospitalario demuestran que la línea genética CC5-t067 es predominante en nuestro medio, aunque se observa la reciente emergencia de cepas SARM CC8, algunas LPV-positivas.
7. En hospitales de zonas con alta densidad de ganado porcino se observa una emergencia de cepas SARM CC398, siendo la resistencia a tetraciclina un buen marcador para su detección.
8. La variante genética de SARM CC1-t127 detectada en esta tesis podría tener relación con animales y se caracteriza por un alto contenido en genes de resistencia.
9. El fenotipo inusual de resistencia a lincosamidas y sensibilidad a macrólidos [L^R-M^S] se asocia a las líneas genéticas de SARM relacionadas con animales

CC398 y CC9. Se describe por primera vez la presencia de los genes *lnu(A)* y *lnu(B)* en cepas SARM CC398.

10. Los genes detectados en estafilococos con dicho fenotipo [L^R - M^S] se localizan en diferentes EGMs: *lnu(A)* en pequeños plásmidos, *lnu(B)* tanto en plásmido de gran tamaño como en cromosoma y *vga* formando parte de plásmidos movilizables o transposones. Algunos de estos plásmidos y estructuras genéticas se caracterizan por primera vez en esta tesis.
11. El gen *cfr*, capaz de producir un fenotipo de multirresistencia, se ha detectado en una cepa SERM ST22 implicada en una infección muy grave. Dicho gen se localiza en el cromosoma y en el plásmido conjugativo pSCFS7 junto al gen de resistencia *fexA*.
12. La caracterización de los plásmidos de *S. aureus* demuestra el carácter altamente dinámico de estas estructuras y la necesidad de analizar su evolución en el tiempo.
13. La transmisión de plásmidos entre diferentes géneros y especies se ve corroborada en esta tesis por la detección de genes *rep* de plásmidos de otros géneros en cepas de *S. aureus*, del plásmido pLNU1 en una cepa de *S. sciuri*, del gen *lnu(B)* en cepas de estafilococos y del plásmido pUR-C2355 en cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*.
14. Nuestro trabajo constituye la primera aproximación a la epidemiología molecular de SARM CC398 en humanos, animales y alimentos en nuestro país. Las cepas SARM CC398 se están diseminando en el medio animal y también humano y podrían actuar como reservorio de genes resistencia debido a su gran capacidad para captar y transferir plásmidos. Aunque estas cepas poseen hasta el momento pocos determinantes de virulencia, es importante controlar y vigilar su evolución futura debido al elevado dinamismo genético de este microorganismo.

CONCLUSIONS

1. Animal to human transmission of SARM CC398 has been demonstrated. Professional contact with pigs in a farm is a risk factor for colonization and infection, circumstance to consider in case of hospitalization. It was also shown the possible MRSA CC398 transmission between colonized and/or infected people living in the same family environment.
2. The efficacy of the decontamination of MRSA CC398 human carriers with mupirocin is low when direct and repeated contact with colonized animals does exist.
3. MRSA CC398 strains usually cause skin and soft tissue infections (with exceptions) and they show a high content of resistance genes and low content of virulence genes.
4. The prevalence of MRSA detected in meat is low (1.6%), and strain characterization suggests that they could be from both animal (CC398) and human origin (CC5 y CC217).
5. A moderate MSSA nasal colonization (19%) and a very low MRSA nasal colonization (0.4%) were detected in healthy people. MSSA CC398 and CC97 strains were identified in people without risk factors or animal contact. These data could support the hypothesis in which the possible origin of animal MRSA CC398 could be MSSA CC398 of human origin.
6. The studies carried out in hospital settings demonstrate the predominance of the variant CC5-t067 in our region. However, a recent dissemination of MRSA CC8 is observed, being some of these strains PVL positive.
7. The emergence of MRSA CC398 strains is observed in regions with a high density of pig farming, being tetracycline-resistance a good initial key-marker for the detection of this clonal lineage.
8. SARM CC1-t127, detected in this work, could be related to animals and is characterized by a high content in resistance genes.
9. The unusual lincosamides resistance/macrolide susceptibility phenotype [L^R-M^S] seems to be associated with SARM CC398 and CC9 lineages related to animals.

The presence of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in MRSA CC398 strains is for the first time described in this thesis.

10. The genes implicated in this phenotype [L^R - M^S] are located in different mobile genetic elements (MGEs): *lnu(A)* in small plasmids, *lnu(B)* in a large plasmid and in the chromosome, and *vga* in mobilizable plasmids or transposons. Some of these plasmids or genetic environments have been for the first time characterized in this study.
11. The *cfrr* gene, responsible for a multiresistant phenotype, was detected in a MRSE ST22 strain implicated in a serious infection. The *cfrr* and *fexA* genes were located in a conjugative plasmid and in the chromosome.
12. The *S. aureus* plasmid characterization demonstrates that these structures are highly dynamic and that it is necessary to analyze their evolution over time.
13. The plasmid transfer between different genera and/or species is corroborated in this work thanks to the detection of: the *rep* genes of plasmids of other genera in *S. aureus* strains, the plasmid pLNU1 in a *S. sciuri* strain, the *lnu(B)* gene in staphylococcal strains and the plasmid pUR2355 in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains.
14. Our study is the first approach to the molecular epidemiology of MRSA CC398 in humans, animals and food in our country. MRSA CC398 is spreading in the animal and also in the human environment and acts as a reservoir of resistance genes thanks to their high capacity of receive and donate plasmids. Although, so far, these strains have few virulence determinants, it is important to monitor their evolution due to the high genetic dynamism of this microorganism.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- 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.
- Allignet J, El Solh N.** Comparative analysis of staphylococcal plasmids carrying three streptogramin-resistance genes: *vat-vgb-vga*. *Plasmid* 1999; 42:134-138.
- Altboum Z, Hertman I, Sarid S.** Penicillinase plasmid linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1985; 47:514-521.
- Appelbaum PC.** The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:16-23.
- Aquino G de V, Maluta RP, de Ávila FA.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococci* on a farm: staff can harbour MRS when animals do not. *Zoonoses Public Health* 2012; 59:1-3.
- 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 *SCCmec* 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, 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.
- 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.
- Avena RM, Bergdoll MS.** Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. Biochem 1967; 6:1474–1480.
- Baba K, Ishihara K, Ozawa M, Tamura Y, Asai T.** Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. Int J Antimicrob Agents 2010; 36:352-354.
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K-I, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K.** Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002; 359:1819-1827.
- Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE, Jensen VF, Guardabassi L.** Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. Vet Microbiol 2007; 121:307-15.
- Bannerman T, Hannock G, Tenover F.** PFGE as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1995; 3:551-555.
- Baquero F.** On the shifting balance: the case of *Staphylococcus aureus* CC398. MBio 2012; 3:pil:e00078-12.
- 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.
- Ben Slama K, Gharsa H, Klibi N, Jouini A, Lozano C, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Boudabous A, Torres C.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy humans with different levels of contact with animals in Tunisia: genetic lineages, methicillin resistance, and virulence factors. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30:499-508.

- Ben Zakour NL, Sturdevant DE, Even S, Guinane CM, Barbey C, Alves PD, Cochet MF, Gautier M, Otto M, Fitzgerald JR, Le Loir Y.** Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. *J Bacteriol* 2008; 190:6302-6317.
- Bhakta M, Bal M.** Identification and characterization of a shuttle plasmid with antibiotic resistance gene from *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2003; 46:413-417.
- Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E.** Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3046-3052.
- 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.
- Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, Troelstra A, Box AT, Voss A, van der Tweel I, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC.** Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2010; 362:9-17.
- Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzani R, Reali S, Lo Russo C, Santagati M, Stefani S.** DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:2336-2340.
- 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.
- 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.
- Brisson-Noël A, Delrieu P, Samain D, Courvalin P.** Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide *o*-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J Biol Chem* 1988; 263:15880-15887.

- Brussow H, Canchaya C, Hardt W-D.** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68:560-602.
- Byrne ME, Rouch DA, Skurray RA.** Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* 1989; 81:361-367.
- Caryl JA, O'Neill AJ.** Complete nucleotide sequence of pGO1, the prototype conjugative plasmid from the staphylococci. *Plasmid* 2009; 62:35-38.
- 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>.
- Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM.** Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Vet Microbiol* 2011; 150:344-348.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *MMWR, Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51:565-567.
- Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, Padilla B, Vindel A.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Pantone-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61:143-149.
- Chen L, Mediavilla JR, Smyth DS, Chavda KD, Ionescu R, Roberts RB, Robinson DA, Kreiswirth BN.** Identification of a novel transposon (Tn6072) and a truncated staphylococcal cassette chromosome *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:3347-3354.
- Cheng M, Antignac A, Kim C, Tomasz A.** Comparative study of the susceptibilities of major epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin and to the new broad-spectrum cephalosporin ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2709-2717.
- Chiang YC, Chang LT, Lin CW, Yang CY, Tsen HY.** PCR primers for the detection of staphylococcal enterotoxins K, L, and M and survey of staphylococcal

enterotoxin types in *Staphylococcus aureus* isolates from food poisoning cases in Taiwan. J Food Protect 2006; 69:1072-1079.

Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY. PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. Int J Food Microbiol 2008; 121:66-73.

Chung M, Dickinson G, de Lencastre H, Tomasz A. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. J Clin Microbiol 2004; 42:542-547.

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.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.

Coia JE, Noor-Hussain I, Platt DJ. The Pathological Society of Great Britain and Ireland. Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin-sensitive and methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and the community. J Med Microbiol 1988; 27:271-276.

Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. J Antimicrob Chemother 1998; 41:11-8.

Corrente M, Normanno G, Martella V, Bellacicco AL, Quaglia NC, Dambrosio A, Buonavoglia D, D'Abramo M, Buonavoglia C. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. Lett Appl Microbiol 2007; 45:535-539.

Couch JL, Soltis MT, Betley MJ. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. J Bacteriol 1988; 170:2954-2960.

Cramer R, Davies JE. Cloning and expression of an APH(3')-III phosphotransferase from *Staphylococcus aureus* in *Streptomyces lividans*. J Antibiot (Tokyo) 1985; 38:1246-50.

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 Institute. Technical University of Denmark 2009.

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, 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.

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.

Davies PR, Wagstrom EA, Bender JB. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1152-1153.

de Azavedo JC, McGavin M, Duncan C, Low DE, McGeer A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B

streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3504-3508.

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 la Fuente R, Ballesteros C, Bautista V, Medina A, Orden JA, Domínguez-Bernal G, Vindel A. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolates from different countries are clonal in nature. *Vet Microbiol* 2011; 150:198-202.

de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheувel MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Huijsdens XW. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 2007; 122:366-372.

de Vries LE, Christensen H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y. Diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:490-500.

Denis O, Suetens C, Hallin M, Catry B, Ramboer I, Dispas M, Willems G, Gordts B, Butaye P, Struelens MJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1098-1101.

Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* 2005; 40:562-573.

Deurenberg RH, Beisser PS, Visschers MJ, Driessen C, Stobberingh EE. Molecular typing of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates collected in the Yogyakarta area in Indonesia, 2006. *Clin Microbiol Infect* 2009a; 16:92-94.

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 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 methicillin-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.
- Domínguez MA, Coll P, Coque T, Vazquez J, Vila J.** Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC* 2005.
- EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System.** Summary of latest data on antibiotic resistance in the European Union 2010. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>
- Edelsberg J, Taneja C, Zervos M, Haque N, Moore C, Reyes K, Spalding J, Jiang J, Oster G.** Trends in US hospital admissions for skin and soft tissue infections. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1516-1518.
- 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 Authority.** Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *The EFSA J* 2009b; 993:1-73.
- Elbir H, Feil EJ, Drancourt M, Roux V, El Sanousi SM, Eshag M, Colque-Navarro P, Kühn I, Flock JI.** Ovine clone ST1464: a predominant genotype of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from sheep in Sudan. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4:235-238.
- Ellington MJ, Perry C, Ganner M, Warner M, McCormick Smith I, Hill RL, Shallcross L, Sabersheikh S, Holmes A, Cookson BD, Kearns AM.** Clinical and molecular epidemiology of ciprofloxacin-susceptible MRSA encoding PVL in England and Wales. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:1113-1121.

- 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.
- Essmann F, Bantel H, Totzke G, Engels IH, Sinha B, Schulze-Osthoff K, Janicke RU.** *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. Cell Death Differ 2003; 10:1260-1272.
- 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.
- Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN.** LEADER Program results for 2009: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6,414 clinical isolates from 56 medical centers in the United States. Antimicrob. Agents Chemother 2011; 55:3684-3690.
- Farzana K, Shah S, Jabeen F.** Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. J Res (Sci) 2004; 15:145-151.
- 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 2011a; 77:7151-7157.
- Feßler AT, Kadlec K, Schwarz S.** Novel apramycin resistance gene *apmA* in bovine and porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates. Antimicrob Agents Chemother 2011b; 55:373-375.
- Feßler AT, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S.** Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. J Antimicrob Chemother 2010; 65:619-625.
- Fey PD, Saïd-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM.** Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:196-203.

- Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI.** Gram-positive pathogens. American Society for Microbiology. Wiley-Blackwell 2006:326-415.
- 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.
- Frea JI, McCoy E, Strong FM.** Purification of type b staphylococcal enterotoxin. J Bacteriol 1963; 86:1308-1313.
- Freitas AR, Coque TM, Novais C, Hammerum AM, Lester CH, Zervos MJ, Donabedian S, Jensen LB, Francia MV, Baquero F, Peixe L.** Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. J Clin Microbiol 2011; 49:925-931.
- 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.
- 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.** 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-Migura L, Liebana E, Jensen LB.** Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. J Antimicrob Chemother 2007; 60:263-268.
- Gargis AS, Heath LS, Heath HE, LeBlanc PA, Sloan GL.** Characterization of pACK4, a mobilizable plasmid from *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Plasmid 2009; 62:201-205.
- 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; 90:319-327.

Gentry DR, McCloskey L, Gwynn MN, Rittenhouse SF, Scangarella N, Shawar R, Holmes DJ. Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4507-4509.

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.

Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 2005; 187:2426-2438.

Gillespie MT, Lyon BR, Messerotti LJ, Skurray RA. Chromosome- and plasmid-mediated gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus* encoded by Tn4001. *J Med Microbiol* 1987; 24:139-144.

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.

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.

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.
- 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, van Duijkeren E, van Nes A, Schoormans A, Broekhuizen-Stins M, Oosting-van Schothorst I, Heederik D, Wagenaar JA.** Evaluation of isolation procedures and chromogenic agar media for the detection of MRSA in nasal swabs from pigs and veal calves. *Vet Microbiol* 2009; 139:121-125.
- 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.
- Gross-Schulman S, Dassey D, Mascola L, Anaya C.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA* 1998; 280:421-422.
- 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* 2010w; 7:e1000215.
- Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E.** Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet* 2006; 368:874-885.

- Guardabassi L, Stegger M, Skov R.** Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Vet Microbiol* 2007; 122:384-386.
- 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.
- 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.** SCCmec 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.
- 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.** Tn5406, a new staphylococcal transposon conferring resistance to streptogramin and related compounds including dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2337-2343.
- Hartman A, Tomasz B.** Altered penicillin-binding-proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19:726-735.

- Hartmeyer GN, Gahrn-Hansen B, Skov RL, Kolmos HJ.** Pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: family transmission and severe pneumonia in a newborn. *Scand J Infect Dis* 2010; 42:318-320.
- Hauschild T, Feßler AT, Kadlec K, Billerbeck C, Schwarz S.** Detection of the novel *vga(E)* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates from cattle and poultry. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:503-504.
- 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.
- Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur V.** Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2007; 2:e1120.
- Highlander S, Hulten K, Qin X, Jiang H, Yerrapragada S, Mason E, Shang Y, Williams T, Fortunov R, Liu Y, Igboeli O, Petrosino J, Tirumalai M, Uzman A, Fox G, Cardenas A, Muzny D, Hemphill L, Ding Y, Dugan S, Blyth P, Buhay C, Dinh H, Hawes A, Holder M, Kovar C, Lee S, Liu W, Nazareth L, Wang Q, Zhou J, Kaplan S, Weinstock G.** Subtle genetic changes enhance virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2007; 7:99.
- Hiramatsu K, Ito T, Hanaki H.** Mechanisms of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Ballière's Clin Infect Dis* 1999; 5:221-242.
- Ho PL, Lo PY, Chow KH, Lau EHY, Lai EL, Cheng VCC, Kao RY.** Vancomycin MIC creep in MRSA isolates from 1997 to 2008 in a healthcare region in Hong Kong. *J Infect* 2010; 60:140-145.
- Holden MT, Lindsay JA, Corton C, Quail MA, Cockfield JD, Pathak S, Batra R, Parkhill J, Bentley SD, Edgeworth JD.** Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J Bacteriol* 2010; 192:888-892.
- Holtfreter S, Grumann D, Schmudde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, Kopron K, Kolata J, Giedrys-Kalemba S, Steinmetz I, Witte W, Bröker BM.** Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2669-2680.
- Horgan M, Abbott Y, Lawlor PG, Rossney A, Coffey A, Fitzgerald GF, McAuliffe O, Paul Ross R.** A study of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus in pigs and in personnel involved in the pig industry in Ireland. *Vet J* 2011; 190:255-259.

Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Euro Surveill* 2010; 15:pii:19542.

Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuevel MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJ, de Neeling AJ. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006; 5:26.

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.

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.

Jackson MP, Iandolo JJ. Cloning and expression of the exfoliative toxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1986; 166:574-580.

Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, Migeville AF, Ge Y, Biek D, Batard E, Potel G. In vivo activity of a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, ceftaroline, against vancomycin-susceptible and -resistant *Enterococcus faecalis* strains in a rabbit endocarditis model: a comparative study with linezolid and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:5300-5302.

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.

Jensen LB, García-Migura L, Valenzuela AJ, Løhr M, Hasman H, Aarestrup FM. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* 2010; 80:25-43.

Jeong HY, Lee JE, Choi BK, Seo KW, Park SH, Kim YL, Baek KM, Lee K, Rhee DK. Molecular epidemiology of community-associated antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* in Seoul, Korea (2003): pervasiveness of multidrug-resistant SCCmec type II methicillin-resistant *S. aureus*. *Microb Drug Resist* 2007; 13:178-185.

Jevons MP. Celbenine-resistant Staphylococci. *BMJ* 1961; 1:124-125.

Jones RN, Fritsche TR, Sader HS, Ross JE. Activity of retapamulin (SB-275833), a novel pleuromutilin, against selected resistant gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:2583-2586.

Jones RN, Pfaller MA, Rhomberg PR, Walter DH. Tiamulin activity against fastidious and non fastidious veterinary and human bacterial isolates: initial development of in vitro susceptibility test methods. *J Clin Microbiol* 2002a; 40:461-465.

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* 2002b; 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* 2009a; 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;doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03842.x.

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 2009b; 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 Tn559 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.

Kaszanyitzky EJ, Janosi S, Egyed Z, Agost G, Semjen G. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. Acta Vet Hung 2003; 51:451-464.

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 *cftr*. 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* 2005a; 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.** *fexA*, a novel *Staphylococcus lentus* gene encoding resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:615-618.
- Kehrenberg C, Schwarz S.** Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558. *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.
- Khan SA.** Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 2005; 53:126-136.
- Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 2008; 128:298-303.
- 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.
- Kitti T, Boonyonying K, Sitthisak S.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among university students in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42:1498-1504.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:505-520.
- 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.

Kluytmans JA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? Clin Microbiol Infect 2010; 16:11-15.

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.

Kreiswirth BN, Projan SJ, Schlievert PM, Novick RP. Toxic shock syndrome toxin-1 is encoded by a variable genetic element. Rev Infect Dis 1989; 11:S75-S82.

Krzywanek K, Metz-Gercek S, Mittermayer H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria. Emerg Infect Dis 2009; 15:766-769.

Kuntová L, Pantůček R, Rájová J, Růžičková V, Petráš P, Mašlaňová I, Doškař J. Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Arch Microbiol 2012; in press.

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K-I, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R-I, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001; 357:1225-1240.

Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Joo YS, Park YH. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. J Antimicrob Chemother 2005; 56:624-632.

Kwong SM, Skurray RA, Firth N. *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. Mol Microbiol 2004; 51:497-509.

- Larsen AR, Böcher S, Stegger M, Goering R, Pallesen LV, Skov R.** Epidemiology of European community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004. *J. Clin Microbiol* 2008; 46:62-68.
- Larsen J, Imanishi M, Hinjoy S, Tharavichitkul P, Duangsong K, Davis MF, Nelson KE, Larsen AR, Skov RL.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST9 in pigs in Thailand. *PLoS One* 2012; 7:e31245.
- Laurent F, Jouy E, Granier S, Bes M, Ruimy R, Felix B, Le Roux A, Sanders P, Chauvin C, Etienne J, Brisabois A.** Molecular characterization of antimicrobial resistance genes and virulence genes by using microarrays in representative ST398 MRSA isolates from pigs in France, abstr. S5:2. ASMESCMIID 2009 Conference on Methicillin-Resistant Staphylococci in Animals, London, England, 22 to 25 September 2009.
- 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.
- Leonard FC, Markey BK.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Vet J* 2008; 175:27-36.
- Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P.** Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 2003; 95:38-43.
- Lewis HC, Molbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sorum M, Skov RL.** Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1383-1389.
- Li M, Wang X, Gao Q, Lu Y.** Molecular characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a teaching hospital in Shanghai, China. *J Med Microbiol* 2009; 58:456-461.
- Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sorum 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.

- Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A, Kanellopoulou M, Schoina S, Papafragas E, Marangos M, Fligou F, Zakyntinos E, Makris D, Protonotariou E, Tsiapara F, Filos K, Diza E, Anastassiou ED, Petinaki E.** Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1070-1071.
- Lim JA, Kwon AR, Kim SK, Chong Y, Lee K, Choi EC.** Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. J Antimicrob Chemother 2002; 49:489-495.
- Lim SK, Nam HM, Jang GC, Lee HS, Jung SC, Kwak HS.** The first detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs in Korea. Vet Microbiol 2012; 155:88-92.
- 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.
- 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.
- Littlejohn TG, DiBerardino D, Messerotti LJ, Spiers SJ, Skurray RA.** Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. Gene 1991; 101:59-66.
- 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.
- Loeza-Lara PD, Soto-Huipé M, Baizabal-Aguirre VM, Ochoa-Zarzosa A, Valdez-Alarcón JJ, Cano-Camacho H, López-Meza JE.** pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance

determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. *Plasmid* 2004; 52:48-56.

- López M, Kadlec K, Schwarz S, Torres C.** First detection of the staphylococcal trimethoprim resistance gene *dfrK* and the *dfrK*-carrying transposon Tn559 in enterococci. *Microb Drug Resist* 2012; 18:13-18.
- 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.
- Lüthje P, Schwarz S.** Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *Antimicrob Chemother* 2006; 57:966-969.
- Lüthje P, von Köckritz-Blickwede M, Schwarz S.** Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyl transferase gene *lnu(A)*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:600-606.
- 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.
- Makgotlho PE, Kock MM, Hoosen A, Lekalakala R, Omar S, Dove M, Ehlers MM.** Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 57:104-115.
- 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.
- Mammìna C, Calà C, Plano MR, Bonura C, Vella A, Monastero R, Palma DM.** Ventilator-associated pneumonia and MRSA ST398, Italy. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:730-731.
- 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.

Martel A, Devriese LA, Cauwert K, de Gussem K, Decostere A, Haesebrouck F.

Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. Avian Pathol 2004; 33:3-7.

Masiuk H, Kopron K, Grumann D, Goerke CR, Kolata J, Giedrys-Kalemba S,

Bröker B, Holtfreter S. Association of recurrent furunculosis with Panton-valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2010; 48:1527-1535.

Massidda O, Mingoia M, Fadda D, Whalen MB, Montanari MP, Varaldo PE.

Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. Plasmid 2006; 55:114-127.

Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. Characteristic expression of three

genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 2003; 220:287-293.

McLaws F, Chopra I, O'Neill AJ. High prevalence of resistance to fusidic acid in

clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother 2008; 61:1040-1043.

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.

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, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN.

First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:2244-2246.

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.

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.

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, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R.

Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. Vet Microbiol 2007; 125:128-140.

Monecke S, Luedicke C, Slickers P, Ehricht R.

Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:1159-1165.

Morar M, Bhullar K, Hughes DW, Junop M, Wright GD.

Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. Structure 2009; 17:1649-1659.

- Morgan M.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J. Antimicrob. Chemother* 2008; 62:1181-1187.
- 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, Coombs 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 Tn554 transposition: deletion analysis. *Plasmid* 1983; 10:260-269.
- Muttaiyah S, Coombs G, Pandey S, Reed P, Ritchie S, Lennon D, Roberts S.** Incidence, risk factors and outcome of Pantone-Valentine leukocidin positive methicillin-susceptible. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3470-3474.
- Nakaminami H, Noguchi N, Nishijima S, Kurokawa I, Sasatsu M.** Characterization of the pTZ2162 encoding multidrug efflux gene *qacB* from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 2008; 60:108-117.
- Nakanishi N, Yoshida S, Wakebe J, Inoue M, Yamaguchi T, Mitsuhashi S.** Mechanisms of clinical resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:2562-2567.
- Neela V, Mohd Zafrul A, Mariana NS, van Belkum A, Liew YK, Rad EG.** Prevalence of ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and pig handlers in Malaysia. *J Clin Microbiol* 2009; 47:4138-4140.
- 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.

- Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Schwarz S, Simon D, Nolte I.** Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:660-662.
- Nimmo GR, Coombs GW.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:401-410.
- 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.
- 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.
- Novotna G, Janata J.** A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, Vga(A)LC, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:4070-4076.
- Nulens E, Stobberingh EE, van Dessel H, Sebastian S, van Tiel FH, Beisser PS, Deurenberg RH.** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates collected in a Dutch University Hospital between 1999 and 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2438-2441.
- 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.
- OIE, World Organization for Animal Health.** OIE list of antimicrobials of veterinary importance. OIE international committee. 75th General Session, 2007 (Resolution No. XXVIII).
- 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.
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM.** Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother 2006; 57:450-460.
- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K.** Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect Immun 2003; 71:6088-6094.
- 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.
- Ono HK, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K.** Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infect Immun 2008; 76:4999-5005.
- Otsuka T, Saito K, Dohmae S, Takano T, Higuchi W, Takizawa Y, Okubo T, Iwakura N, Yamamoto T.** Key adhesin gene in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 2006; 346:1234-1244.
- Overesch G, Büttner S, Rossano A, Perreten V.** The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland. BMC Vet Res 2011; 7:30.

- Pan A, Battisti A, Zoncada A, Bernieri F, Boldini M, Franco A, Giorgi M, Iurescia M, Lorenzotti S, Martinotti M, Monaco M, Pantostiet A.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:845-847.
- Park HK, Woo SY, Jung YJ, Lee EO, Cha JE, Park HS, Lee SJ.** Detection of virulence genes of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from suprapubic urine from infants with fever. *J Bacteriol Virol* 2008; 38:189-196.
- 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; 63:21-31.
- Perichon B, Courvalin P.** VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:4580-4587.
- Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Grönlund Andersson U, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L.** Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1145-1154.
- 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.
- Plano LR.** *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: how they cause disease. *J Invest Dermatol* 2004; 122:1070-1077.

- Pletinckx LJ, Verheghe M, Dewulf J, Crombé F, De Bleecker Y, Rasschaert G, Goddeeris BM, De Man I.** Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs. *Infect Genet Evol* 2011; 11:2133-2137.
- Pomba C, Hasman H, Cavaco LM, da Fonseca JD, Aarestrup FM.** First description of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:193-194.
- Potel C, Alvarez-Fernández M, Constenla L, Alvarez P, Perez S.** First human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:351-352.
- 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.
- Prudhomme M, Turlan C, Claverys JP, Chandler M.** Diversity of Tn4001 transposition products: the flanking IS256 elements can form tandem dimers and IS circles. *J Bacteriol* 2002; 184:433-443.
- Pu S, Han F, Ge B.** Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:265-267.
- Qi W, Ender M, O'Brien F, Imhof A.** Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5164-5170.
- Rabello RF, Moreira BM, Lopes RM, Teixeira LM, Riley LW, Castro AC.** Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol* 2007; 56:1505-1511.
- 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.

- 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.
- 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.
- Rosander A, Connolly E, Roos S.** Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:6032-6040.
- Rossney A, O'Connell S.** Emerging high-level mupirocin resistance among MRSA isolates in Ireland. *Euro Surveill* 2008; 13:pii:8084.
- Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LSL, Jackson CA, Skurray RA.** Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol* 1989; 3:161-175.
- Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P.** *Staphylococcus aureus* host range and human–bovine host shift. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:5908-5915.
- Sakwinska O, Kuhn G, Balmelli C, Francioli P, Giddey M, Perreten V, Riesen A, Zysset F, Blanc DS, Moreillon P.** Genetic diversity and ecological success of colonizing *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:175-183.
- 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.

- Schijffelen MJ, Boel CH, van Strijp JA, Fluit AC.** Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 2010; 11:376.
- Schmitt-van de Leemput E, Zadoks RN.** Genotypic and phenotypic detection of macrolide and lincosamide resistance in *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci* 2007; 90:5089-5096.
- 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, Kadlec K, Strommenger B.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:282-285.
- Schwarz S, Roberts MC, Werckenthin C, Pang Y, Lange C.** Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet Microbiol* 1998; 63:217-227.
- Schwendener S, Perreten V.** New transposon Tn6133 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.
- Sergio DM, Koh TH, Hsu LY, Ogden BE, Goh AL, Chow PK.** Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol* 2007; 56:1107-1109.
- Shearer JE, Wireman J, Hostetler J, Forberger H, Borman J, Gill J, Sanchez S, Mankin A, Lamarre J, Lindsay JA, Bayles K, Nicholson A, O'Brien F, Jensen SO, Firth N, Skurray RA, Summers AO.** Major families of multiresistant

plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. G3 (Bethesda) 2011; 1:581-591.

Shibuya Y, Hara M, Higuchi W. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Japan. J Infect Chemother 2008; 14:439-441.

Shopsin B, Gómez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *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, Brennan OM, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S, Slickers P, Coleman DC. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfr* in a Panton-Valentine Leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:4978-4984.

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.

Shukla SK, Karow ME, Brady JM, Stemper ME, Kislow J, Moore N, Wroblewski K, Chyou PH, Warshauer DM, Reed KD, Lynfield R, Schwan WR. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 2010; 48:3582-3592.

Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552

among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2797-2803.

Simpson V, Davison N, Hudson L, Whatmore AM. *Staphylococcus aureus* ST49 infection in red squirrels. *Vet Rec* 2010; 167:69.

Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, Kruze JV, Bradley AJ, Zadoks RN, Dowson CG. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 2005a; 43:4737-4743.

Smith JM, Cook GM. A decade of community MRSA in New Zealand. *Epidemiol Infect* 2005b; 133:899-904.

Smith MC, Thomas CD. An accessory protein is required for relaxosome formation by small staphylococcal plasmids. *J Bacteriol* 2004; 186:3363-3373.

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.

Smith TC, Pearson N. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:327-339.

Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, Enright MC, Smyth CJ. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2009; 58:1343-1353.

Smyth DS, Hartigan PJ, Meaney WJ, Fitzgerald JR, Deobald CF, Bohach GA, Smyth CJ. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J Med Microbiol* 2005; 54:401-411.

Sola C, Paganini H, Egea AL, Moyano AJ, Garnerio A, Kevric I, Culasso C, Vindel A; Study Group of CA-MRSA in Children, Argentina-2007, Lopardo H, Bocco JL. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community on set staphylococcal infections in Argentinean children. *PLoS One* 2012; 7:e30487.

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.

Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. Int J Antimicrob Agents 2012; 39:273-282.

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.

Tenhagen BA, Fetsch A, Stührenberg B, Schleuter G, Guerra B, Hammerl JA, Hertwig S, Kowall J, Kämpe U, Schroeter A, Bräunig J, Käsbohrer A, Appel B. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. Vet Rec 2009; 165:589-593.

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.

Thakker-Varia S, Jensen WD, Moon-McDermott L, Weinstein MP, Dubin DT. Molecular epidemiology of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:735-743.

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.

Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I staphylococci. Lancet 1978; 2:1116-1118.

- Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, Mankin AS.** Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol* 2007; 64:1506-1514.
- 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.
- Towner KJ, Evans B, Villa L, Levi K, Hamouda A, Amyes SG, Carattoli A.** Distribution of intrinsic plasmid replicase genes and their association with carbapenem-hydrolyzing class D-lactamase genes in european clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2154-2159.
- 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.
- Tracey Berg, Neville Firth, Sumalee Apisiridej, Anusha Hettiaratchi, Amornrut Leelaporn, Ronald A. Skurray.** Complete Nucleotide Sequence of pSK41: Evolution of Staphylococcal Conjugative Multiresistance Plasmids. *J Bacteriol* 1998; 180:4350-4359.
- Trostle SS, Peavey CL, King DS, Hartmann FA.** Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infection following repair of an ulnar fracture and humeroradial joint luxation in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218:554-559.
- 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.
- Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C, Trotonda P, Foster TJ, Lasa I, Penades JR.** Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 2003; 49:193-210.
- 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, Grubb WB.** A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 1991; 78:33-36.

- 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.
- 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:pil:e00027-12.
- 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 aureus*. *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 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 Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, Allaart JG, van Nes A, Wagenaar JA, Fluit AC.** Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pigfarms. *Vet Microbiol* 2008; 126:383-389.
- van Duijkeren E, Jansen MD, Flemming SC, de Neeling H, Wagenaar JA, Schoormans AH, van Nes A, Fluit AC.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1408-1410.
- van Duijkeren E, Ten Horn L, Wagenaar JA, de Bruijn M, Laarhoven L, Verstappen K, de Weerd W, Meessen N, Duim B.** Suspected horse-to-human transmission of MRSA ST398. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1137-1139.

- van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J.** Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007a; 13:1834-1839.
- van Loo IH, Diederer 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, Bonten M, Wenzel RP, Kluytmans JA.** Intranasal mupirocin for reduction of *Staphylococcus aureus* infections in surgical patients with nasal carriage: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:254-261.
- van Rijen MM, Bosch T, Heck ME, Kluytmans JA.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and transmission in a Dutch hospital. *J Hosp Infect* 2009; 72:299-306.
- Vancraeynest D, Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemauwe C, Hermans K.** International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53:418-422.
- 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.
- Varella Coelho ML, Ceotto H, Madureira DJ, Nes IF, Bastos Mdo C.** Mobilization functions of the bacteriocinogenic plasmid pRJ6 of *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol* 2009; 47:327-336.
- Vestergaard M, Cavaco LM, Sirichote P, Unahalekhaka A, Dangsakul W, Svendsen CA, Aarestrup FM, Hendriksen RS.** SCCmec Type IX element in

methicillin resistant *Staphylococcus aureus* spa type t337 (CC9) isolated from pigs and pork in Thailand. *Front Microbiol* 2012; 3:103.

Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol* 2003; 95:133-147.

Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1965-1966.

Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Lina G, Kreiswirth BN, DeLeo FR. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis* 2006; 194:1761-1770.

Wagenaar JA, Yue H, Pritchard J, Broekhuizen-Stins M, Huijsdens X, Mevius DJ, Bosch T, Van Duijkeren E. Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol* 2009; 139:405-409.

Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehricht R, Slickers P, Soba A, Wleklinski CG, Wieler LH, Lübke-Becker A. Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2009a; 47:704-710.

Walther B, Wieler LH, Friedrich AW, Kohn B, Brunnberg L, Lübke-Becker A. *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization rates among personnel and dogs in a small animal hospital: association with nosocomial infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2009b; 122:178-185.

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.

Waters AE, Contente-Cuomo T, Buchhagen J, Liu CM, Watson L, Pearce K, Foster JT, Bowers J, Driebe EM, Engelthaler DM, Keim PS, Price LB. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. *Clin Infect Dis* 2011; 52:1227-1230.

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.

- Weese JS, Rousseau J, Traub-Dargatz JL, Willey BM, McGeer AJ, Low DE.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. J Am Vet Med Assoc 2005; 226:580-583.
- Weese JS.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. ILAR J 2010b; 51:233-244.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC.** Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 2003; 302:1569-1571.
- 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.
- Werckenthin C, Schwarz S, Roberts MC.** Integration of pT181-like tetracycline resistance plasmids into large staphylococcal plasmids involves IS257. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:2542-2544.
- 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.
- 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 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 Bacteriol 2001; 183:2417-2424.
- Wulf M, Voss A.** MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen? Clin Microbiol Infect 2008; 14:519-521.
- Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y.** Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. Br J Ophthalmol 2008; 92:848-851.

- 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.
- 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.
- Yasuda R, Kawano J, Matsuo E, Masuda T, Shimizu A, Anzai T, Hashikura S.** Distribution of *mecA*-harboring staphylococci in healthy mares. *J Vet Med Sci* 2002; 64:821-827.
- Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, Abrams T, Dul M, Kim J, McGowan KL, Coffin SE.** Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001-2003. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25:343-348.
- Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR.** Community-acquired methicillin-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.
- Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, Qin ZQ, Miao YG, Wang WY, Chen RS, Shen Y, Chen Z, Yuan ZH, Zhao GP, Qu D, Danchin A, Wen YM.** Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming

Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228). Mol Microbiol 2003; 49:1577-1593.

Zhu W, Clark NC, McDougal LK, Hageman J, McDonald LC, Patel JB.

Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:452-7.

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 IS256. Mol Microbiol 1999; 32:345-356.

ANEXOS

ANEXO 1: PUBLICACIONES

readmitted 18 days later with nasal congestion, cough, and high fever. PCR results were again positive for pandemic (H1N1) 2009, and the patient was successfully treated with oseltamivir.

Patient 2 and probably patient 3 acquired their infections while hospitalized, suggesting potential nosocomial transmission. No other respiratory viruses were found in any of these patients. The viral isolates were all tested (LightMix for detection of influenza A virus oseltamivir resistance [H274Y]; TIB MOLBIOL) for possible resistance to oseltamivir, but none had the resistance-implicated H274Y mutation in the neuraminidase gene.

Shedding of seasonal influenza A virus ceases within 5–7 days during natural infection and during infections treated with neuraminidase inhibitors (4). Although clearing of virus after the first infection was not documented in the 3 patients described here, it is unlikely that virus persisted between the 2 episodes of influenza since each of the patients fully recovered after specific antiviral drug treatment. However, we cannot rule out that patient 2 may have never cleared the virus due to her immune suppression.

As described by mathematical modeling (5), the 3 patients described were susceptible to reinfection with pandemic (H1N1) 2009 due to the high rate of community infection and to their incomplete immunologic protection within the period of reexposure. During the current pandemic of influenza subtype H1N1, healthcare workers and patients should be aware that symptomatic reinfection might occur after a first episode of infection.

**Carlos M. Perez,
Marcela Ferres,
and Jaime A. Labarca**

Author affiliations: Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

DOI: 10.3201/eid1601.091420

References

1. World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009—update 58 [cited 2009 Jul 12]. Available from http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html
2. Ministerio de Salud. Influenza [in Spanish] [cited 2009 Sep 14]. Available from http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/page/minsalcl/g_varios/influenza.html
3. Treanor JJ. Influenza virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. New York: Elsevier; 2005. p. 2060–85.
4. Aoki FY, Boivin G. Influenza virus shedding: excretion patterns and effects of antiviral treatment. *J Clin Virol*. 2009;44:255–61. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.010
5. Gökaydin D, Oliveira-Martins JB, Gordo I, Gomes MG. The reinfection threshold regulates pathogen diversity: the case of influenza. *J R Soc Interface*. 2007;4:137–42. DOI: 10.1098/rsif.2006.0159

Address for correspondence: Carlos Miguel Perez, Pontificia Universidad Católica de Chile – Medicine, Marcoleta 357, Santiago 00000, Chile; email: cape@med.puc.cl

Skin Lesion Caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain¹

To the Editor: Human infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 398 (ST398) have been emerging in recent years in Europe (1,2). Pigs represent a common reservoir of MRSA ST398, and working with these animals may constitute a risk factor for MRSA carriage and possible infection (2–4). We report a case of human infection caused by MRSA ST398 in Spain.

A 12-year-old girl living close to a pig farm, where her father and mother worked, sought treatment for a skin lesion on her chin. Two types of MRSA were recovered from the lesion, and it resolved after topical

treatment with mupirocin over 10 days. MRSA isolates recovered were characterized by multilocus sequence typing (MLST) and by staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec*, *spa*, and *agr* typing as described (3). The presence of genes encoding Pantón-Valentine leukocidin (PVL) (*lukF/lukS*), toxic shock syndrome toxin-1 (*tsst1*), and exfoliative-toxin A and B (*eta*, *etb*) was investigated by PCR (2,3). Antimicrobial susceptibility tests were carried out by using the VITEK-2 system (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France), and *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *mrsA*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *ant(4’)-Ia*, *aph(3’)-III*, and *aph(2’)-aac(6’)* resistance genes were studied by PCR (5). *dfpK* gene detection was performed by using primers designed from the sequence FM207105 included in GenBank (*dfpK-F* 5'-GAGAATCCCAGAGGATTGGG; *dfpK-R*, 5'-CAAGAAGCTTTTCGCTCATAAA), and the obtained amplicons were sequenced for confirmation. Mutations in quinolone targets were determined by sequence analysis of *grrA* and *gyrA* genes (6). In addition, MRSA isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (www.harmony-microbe.net/microtyping.htm).

One of the clinical MRSA isolates recovered from the lesion and typed as ST398-*spa*-t011 showed resistance to tetracycline, macrolides, and lincosamides and harbored 5 antimicrobial resistance genes. The second MRSA strain was typed as ST1-*spa*-t127 and showed a multiresistance phenotype with 11 resistance genes, as well as the Ser80Phe and Ser84Leu amino acid changes in GrlA and GyrA proteins, respectively.

To establish the MRSA nasal colonization status of the patient and of her relatives (father, mother, and brother, all of whom had contact with

¹This study was presented as a poster at the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 2009.

animals) and to elucidate the possible origin of these strains, we analyzed nasal swabs for MRSA recovery. Nasal samples were plated in oxacillin-resistant *S. aureus* agar media (ORSA, Termofisher, UK), colistin nalidixic acid agar media (bioMérieux), and blood agar media (Oxoid); colonies suggestive of *S. aureus* were initially selected, further identified, and characterized for bacterial typing and antimicrobial resistance mechanisms. Samples from all relatives and the patient showed that all 4 persons were MRSA nasal carriers presenting the following genetic lineages: patient girl, ST398-t108; mother, ST398-t108 and ST1-t127; father, ST398-t108; and brother, ST398-t011 (2 variants) (Table). MRSA t127 and t011 variants detected in the skin lesion of the patient were not found in her nasal sample but were found in the nasal samples of her mother and brother. Another study has been initiated to analyze the presence of MRSA in nasal swabs of swine on the farm.

The ST1-t127 strains obtained from the skin lesion of the girl (C1569)

and from the mother's nasal sample (C1578) showed the same multiresistance phenotype and genotype (Table) and an indistinguishable PFGE pattern. This clonal type seems to be associated with community-acquired MRSA isolates circulating in Europe (7). The animal origin of this MRSA type and its possible transmission from horses and cows to humans has been suggested in previous reports (8,9).

In addition, all family members were colonized by MRSA ST398. All recovered nasal MRSA ST398 strains showed resistance to β -lactams, macrolides, lincosamide, and tetracycline, and 3 strains also showed diminished susceptibility to quinolones. Strain ST398 C1576, recovered from the brother, showed a multiresistance phenotype (Table).

The ST398 strains of our study were classified in the *spa*-types t011 and t108, 2 of the most frequently described types of the clonal complex 398 (1,4) and were untypeable by PFGE. Most MRSA ST398 strains in our study showed a resistance phenotype that included tetracycline, mac-

rolides, and lincosamides. Tetracycline resistance is a common trait of ST398 and suggests that its use in veterinary medicine may have been implicated in selection of this resistance. The first reports, describing ST398 strains, indicated β -lactams and tetracycline as the unique resistance markers, which were susceptible to other antimicrobial agents. Nevertheless, reports of ST398 showing resistance to other antimicrobial drugs are increasing. One of the ST398 strains from the brother showed an uncommon multiresistance phenotype. Moreover, all the MRSA strains of this study were negative for all tested toxin genes, included PVL, although some ST398 PVL-positive strains have been occasionally described (10).

We report a skin lesion on the daughter of a pig farmer in Spain associated with ST398-t011 and ST1-t127 MRSA strains. The results obtained suggest the specific animal origin of these strains and subsequent transference among family members. Of special interest is the multiresistance phenotype of the clinical and nasal

Table. Characteristics of the 9 MRSA strains recovered in Spain from a patient's lesion and from nasal samples obtained from patient's family members*

Strain	Origin of sample	SCC <i>mec</i> type	MLST	<i>spa</i> type	<i>agr</i>	Antimicrobial resistance phenotype	Resistance genes detected	Amino acid change in:	
								GrlA	GyrA
C1570	Patient/ skin lesion	V	ST398	t011	I	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL	<i>mecA, tetK, ermA, ermC, msrA</i>	NP	NP
C1569	Patient/ skin lesion	II	ST1	t127	III	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV, SXT	<i>mecA, tetL, tetK, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2')-acc(6'), ant(4')-Ia, aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
C1571	Patient/ nasal swab	V	ST398	t108	I	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL, CIP†, LEV†	<i>mecA, tetK, tetL, tetM, ermA, ermC, msrA</i>	Wild	Wild
C1577	Mother/ nasal swab	V	ST398	t108	I	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL, CIP†, LEV†	<i>mecA, tetK, tetM, ermA, ermC, msrA</i>	Wild	Wild
C1578	Mother/ nasal swab	II	ST1	t127	III	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL, GEN, TOB, KAN, CIP, LEV, SXT	<i>mecA, tetL, tetK, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2')-acc(6'), ant(4')-Ia, aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
C1574	Brother/ nasal swab	V	ST398	t011	I	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL	<i>mecA, tetK, ermA, ermC, msrA</i>	NP	NP
C1576	Brother/ nasal swab	V	ST398	t011	I	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL, GEN, TOB, KAN, SXT	<i>mecA, tetL, tetK, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2')-acc(6'), ant(4')-Ia, aph(3'), dfrK</i>	NP	NP
C1572	Father/ nasal swab	V	ST398	t108	I	OXA, FOX, TET, ERY, CLI, TEL, CIP†, LEV†	<i>mecA, tetK, tetL, tetM, ermA, ermC, msrA</i>	Wild	Wild

*MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; SCC, staphylococcal cassette chromosome; MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type; OXA, oxacillin; FOX, cefoxitin; TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TEL, telithromycin; NP, not performed; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim.

†Intermediate category for the indicated antimicrobial drug.

ST1-t127 MRSA clinical strains and of 1 nasal strain belonging to ST398 lineage. Nasal colonization by different ST398 genetic lineages and by other lineages of MRSA as ST1-t127 seems to be frequent in persons living in close proximity to farm animals. Dissemination of MRSA ST398 (and probably also MRSA ST1) in humans who have contact with farm animals, is an emerging problem in Spain.

This study was financially supported by the Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and FEDER. C.L. has a fellowship FPI from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain.

**Carmen Aspiroz,
Carmen Lozano, Ana Vindel,
Juan J. Lasarte,
Myriam Zarazaga,
and Carmen Torres**

Author affiliations: Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain (C. Aspiroz); Universidad de La Rioja, Logroño, Spain (C. Lozano, M. Zarazaga, C. Torres); Centro Nacional Microbiología, Madrid, Spain (A. Vindel); and Centro Salud San Mateo de Gállego, Zaragoza (J.J. Lasarte)

DOI: 10.3201/eid1601.090694

References

1. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:255–8. DOI: 10.3201/eid1302.060924
2. Lewis HC, Molbak M, Reese C, Aarstrup FM, Selchau M, Sorum M, et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1383–9. DOI: 10.3201/eid1409.071576
3. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuve MG, Heck ME, Pluister GN, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;10:26. DOI: 10.1186/1476-0711-5-26

4. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1965–6.
5. Domínguez E, Zarazaga M, Torres C. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2638–41. DOI: 10.1128/JCM.40.7.2638-2641.2002
6. Schmitz FJ, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Luckefahr M, Klootwijk M, et al. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grrA*, *grrB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41:481–4. DOI: 10.1093/jac/41.4.481
7. Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:670–6. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02017.x
8. Juhász-Kaszanyitzky E, Jánosi S, Somogyi P, Dán Á, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:630–2. DOI: 10.3201/eid1304.060833
9. 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;14:307–10. DOI: 10.1089/mdr.2008.0845
10. Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Oberg S, Karlsson L, Ahren C. Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1271–2. DOI: 10.3201/eid1408.071427

Address for correspondence: Carmen Torres, Area Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logrono, Spain; email: carmen.torres@unirioja.es



Identification of a Rotavirus G12 Strain, Indonesia

To the Editor: Group A rotaviruses are the most common etiologic agents of acute gastroenteritis in infants and young children, each year resulting in ≈ 100 million diarrhea episodes and 600,000 deaths worldwide (1). The genome of rotavirus comprises 11 segments of double-stranded RNA, which encode 6 structural viral proteins (VPs) and 6 nonstructural proteins (NSPs). Recent scientific reports have identified novel rotavirus strains, such as G12 (2–5), which were first described in 1987 among Filipino children with diarrhea (6). In Indonesia, a rotavirus study showed that a broad variety of VP7 types (G1, G2, G3, G4, G8, G9) and VP4 types (P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11]), especially G9 and P[8] and G9P[8], were the genotype combinations most frequently encountered (7).

From 2005 through 2008, we conducted a nationwide surveillance study among children who had diarrhea to determine etiologies among Indonesian children seeking health services for diarrhea at hospitals and health clinics. Patients were enrolled after obtaining consent from parents/guardians of those eligible in accordance with an institutional review board protocol approved by the US Naval Medical Research Unit No. 2 (NAMRU-2) and the Ethical Committee of the Indonesian National Health Research and Development Institute. Stool specimens and clinical enrollment data were collected for each eligible patient, and all collected items were transported to NAMRU-2 in Jakarta, Indonesia. In December 2007, a stool specimen was collected from a 14-day-old afebrile infant brought to Sumber Waras Hospital in West Jakarta with diarrhea, vomiting, moderate dehydration, and malnutrition. This patient was infected with the rotavi-

5. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 108–118.
6. Strommenger B, Bräulke C, Pasemann B, Schmidt C, Witte W. Multiplex PCR for rapid detection of *Staphylococcus aureus* isolates suspected to represent community-acquired strains. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 582–587.
7. Mittermayer H, Metz-Gercek S, Allerberger F. Resistenzbericht Oesterr-eich AURES 2008. Vienna: Federal Ministry for Health, 2009; 34–39.
8. EARSS, Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2008. Available at: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf (14 April 2010). 2008; 55–58.
9. Witte W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: what do we need to know? *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 17–25.
10. Fang H, Hedin G, Li G, Nord CE. Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Stockholm, 2000–2005. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 370–376.
11. Ruimy R, Maiga A, Armand-Lefevre L et al. 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: 3962–3968.
12. Ruppitsch W, Stöger A, Schmid D et al. Occurrence of the USA300 community-acquired *Staphylococcus aureus* clone in Austria. *Euro Surveill* 2007; 12: E071025.
13. Coombs GW, Monecke S, Ehrlich R et al. Differentiation of clonal complex 59 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1914–1921.

erm(A) (13), *erm(C)* (13), *msr(A)* (11), *lnu(A)* (21), *aph(2'')*-*acc(6')* (3), *ant(4')* (13), *aph(3')* (12), *dfrSI* (15) and *dfrK* (22). Seventeen human and animal MRSA-ST398 isolates showed indistinguishable PFGE patterns (A1-*spa-t011* or B2-*spa-t108*) and similar phenotypic-genotypic characteristics, including the presence of the *lnu(A)* gene, associated with lincomycin resistance. Potential pig-to-human transference of ST398 is suggested in this study. The first detection of the *lnu(A)* gene in MRSA-ST398 is reported.

Keywords: MRSA, ST398, pigs, *spa-t108*, *spa-t011*

Original Submission: 27 August 2010; **Revised Submission:** 6 November 2010; **Accepted:** 18 November 2010

Editor: G. Lina

Article published online: 26 November 2010

Clin Microbiol Infect 2011; 17: 923–927

10.1111/j.1469-0691.2010.03437.x

Corresponding author: Carmen Torres, Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain
E-mail: carmen.torres@unirioja.es

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

C. Lozano¹, C. Aspiroz², M. Ara³, E. Gómez-Sanz¹, M. Zarazaga¹ and C. Torres¹

1) Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, 2) Unidad de Microbiología, Hospital Royo Villanova and 3) Servicio de Dermatología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain

Abstract

Skin infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-ST398 was detected in a pig-farmer, and MRSA-ST398 isolates were also detected in nasal samples of the patient and of 11/12 pigs on his farm. Twelve MRSA isolates were obtained from skin lesions ($n = 6$) and nasal samples ($n = 6$) of the patient in two sampling moments and 11 MRSA isolates from nasal samples of pigs. They were typed as t011-SCC*mecIVa-agrI* and t108-SCC*mecV-agrI* (patient and pigs) and t588-SCC*mecV-agrI* (patient). The following resistance genes were detected (number isolates): *tet(K)* (1), *tet(L)* (23), *tet(M)* (13),

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of sequence type ST398 has been identified either colonizing or causing infections in animals and humans, and has been found to cause diseases related to occupational contact with pigs. The prevalence of colonization by these strains in those who work with pigs has been proved to be higher than in people without this risk factor [1]. MRSA-ST398 is characterized by its resistance to tetracycline, one of the main antibiotics used in pig farming. Moreover, an unusual resistance phenotype showing clindamycin resistance but erythromycin susceptibility has been reported in a few MRSA-ST398 isolates [2–5]. Recently, this phenotype has been associated in some strains with the presence of plasmid-borne resistance genes *vga(A)* or *vga(C)* [6]. The expression of lincomycin-modifying enzymes could confer resistance to lincomycin but not to erythromycin, and this mechanism is infrequent in *S. aureus*, and has not been reported so far in MRSA-ST398 isolates. The aim of this study was to perform the genetic characterization of 23 MRSA isolates (12 recovered from a patient with skin lesions and 11 from pigs on the farm where the patient worked) in order to determine the possible MRSA animal-to-human transmission, and to characterize the mechanism of lincomycin resistance detected in 21 of 23

of these MRSA isolates (12 from a human and nine from pigs).

A 54-year-old patient, who worked on a pig farm in Spain, presented skin lesions, diagnosed as psoriasis by the dermatologist. In order to know whether superinfection with bacteria or fungi could be also involved, three samples from lesions (scalp, dorsum of the nose and chin) and moreover two from both nasal ducts were obtained (October 2008, period 1) and submitted to microbiological analysis. Heavy growth of MRSA isolates was obtained in all five tested samples of the patient and they were identified by classical microbiological tests and confirmed by detection of *nuc* and *mecA* genes by PCR [7]. Five MRSA isolates (one per sample) were further characterized.

Nasal samples of two family members of the patient (wife and son) who did not live close to the farm and had no contact with pigs were also tested in October 2008, and they were negative for *S. aureus* and MRSA.

The patient was treated with an antiseptic gel for scalp and beard washing, a methylprednisolone solution and a cream with betametasone and fusidic acid for cutaneous lesions, and nasal MRSA decolonization with mupirocin. The patient had some clinical improvement of the lesions in the next weeks, although they were not resolved, and he returned to a new control with his dermatologist 3 months later (January 2009, period 2). New samples were then obtained from three skin lesions (ear canal, hand and chin) and from both nasal ducts, and they were submitted to microbiological study. MRSA isolates were recovered again from skin samples (three isolates, one isolate per sample) and nasal samples (four isolates, two isolates per sample).

In addition, nasal swabs from 12 pigs on the farm where the patient worked were randomly obtained (January 2009, period 2). They were inoculated in brain-heart-infusion-broth (BHI, BD) containing 6.5% NaCl and incubated at 35°C for 24 h, and later they were seeded on oxacillin-resistance-screening agar plates (ORSAB, Oxoid) with oxacillin (2 mg/L), and were incubated at 35°C for 36 h. MRSA was detected in 11 of these 12 animals (91.6%), and one MRSA isolate per animal was further characterized.

Antimicrobial susceptibility to 23 antibiotics was determined by the VITEK-2 system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and by disk-diffusion assay in the 23 recovered MRSA isolates (12 from the patient and 11 from the pigs) following CLSI recommendations [8]. The tested antibiotics were: penicillin, oxacillin, cefoxitin, tetracycline, erythromycin, telithromycin, clindamycin, lincomycin, gentamicin, tobramycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, ciprofloxacin, levofloxacin, vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, fosfomycin, fusidic acid, mupirocin, nitrofurantoin, rifampin and

kanamycin. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used as control strains. Lincomycin and clindamycin susceptibility was also studied by the agar dilution method [8,9]. CLSI breakpoints [8] were used for all antibiotics, with two exceptions: lincomycin breakpoints were considered as recommended by the Société Française de Microbiologie [9], and mupirocin breakpoints as considered by Oliveria *et al.* 2007 [10]. The presence of *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)*, *cfr*, *vga(C)*, *lsa(B)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *aph(2'')*-*acc(6')*, *ant(4')*, *aph(3')*, *dfrS1*, *dfrD* and *dfrK* antimicrobial resistance genes was studied by PCR and sequencing [7,11]. MRSA isolates of human and animal origin were typed (PFGE, MLST, *SCCmec*-, *spa*- and *agr*-typing) as previously described [7,12–14]. Characteristics of MRSA of human and animal origin are included in Table 1.

All five MRSA isolates recovered from the patient in period 1 before treatment (three from skin lesions and two from nasal samples) and four of the seven isolates obtained after the treatment (three from lesions and one from nasal sample) were typed as MRSA-ST398-t011, *SCCmec*-IVa and *agr*-I and showed resistance to tetracycline, erythromycin, telithromycin, clindamycin, lincomycin, tobramycin, kanamycin and sulfamethoxazole-trimethoprim (Table 1).

The remaining three MRSA nasal isolates obtained from the patient after treatment were typed as ST398-t108-*SCCmecV-agr*I (two isolates) and ST398-t588-*SCCmecV-agr*I (one isolate), and showed different antimicrobial resistance phenotypes and genotypes (Table 1).

Eleven MRSA isolates were recovered from pigs. Seven of them were typed as ST398-t108-*SCCmecV-agr*I and four MRSA isolates of pig origin were typed as ST398-t011-*SCCmec*I-Va-*agr*I (Table 1).

Twenty-one of 23 MRSA isolates obtained in this study (12/12 isolates from the patient and 9/11 isolates of animal origin) presented a high level of resistance to lincomycin and harboured the *lnu(A)* gene. Thirteen of these isolates showed resistance to erythromycin/clindamycin/lincomycin (ST398-t011-*SCCmec*I-Va-*agr*I, ST398-t108-*SCCmec*V-*agr*I and ST398-t588-*SCCmec*V-*agr*I) and harboured the *erm(A)* and *erm(C)* genes, in addition to the *lnu(A)* gene; the remaining eight isolates presented an unusual erythromycin/clindamycin-susceptibility and lincomycin-resistance phenotype (ST398-t108-*SCCmec*V-*agr*I) and lacked *erm* genes (Table 1).

Three unrelated pulsotypes (A–C) were identified after analysis of PFGE-patterns of all human and animal MRSA isolates [15]. In addition, pulsotype A comprised five subtypes (A1–A5) and pulsotype B two subtypes (B1 and B2) (Fig. 1). All MRSA isolates with *spa*-type t011 were ascribed to pulsotype-A, those with t108 to pulsotype-B, and the MRSA iso-

TABLE 1. Characteristics of the MRSA-ST398 isolates recovered from the patient and from pigs on the farm

Strain	Origin	Period ^a	spa/SCmec	agr	PFGE pattern	MIC (mg/L)		Antimicrobial resistance phenotype for non-beta-lactams	Resistance genes detected
						CLI	LIN		
Patient									
C1676	Chin	1	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT-CIP ¹ -LVX ¹	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), Inu(A) , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1677	Dorsum of nose	1	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT-CIP ¹ -LVX ¹	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), Inu(A) , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1675	Scalp	1	t011/IVa	1	A2	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), Inu(A) , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1673	Nasal	1	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT-CIP ¹ -LVX ¹	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1674	Nasal	1	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1870	Ear canal	2	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1871	Chin	2	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1872	Hand	2	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1856	Nasal	2	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1857	Nasal	2	t108/V	1	B1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), Inu(A) , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1859	Nasal	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT	tet(L), erm(A), erm(C), Inu(A) , dfrK
C1858	Nasal	2	t588/V	1	C	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-SXT	tet(K), tet(L), erm(A), erm(C), msr(A), Inu(A) , dfrS1, dfrK
Pigs									
C1842	Nasal-1	2	t011/IVa	1	A1	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-TOB-KAN-SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), Inu(A) , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1844	Nasal-2	2	t011/IVa	1	A3	>128	>128	TET-ERY-TEL-CL-LIN-GEN-TOB-KAN ¹ -SXT	tet(L), tet(M), erm(A), erm(C), msr(A), Inu(A) , aph(2 ⁺)-acc(6) ⁺ , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1849	Nasal-3	2	t011/IVa	1	A4	0.125	1	TET-GEN-TOB-KAN-SXT	aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1850	Nasal-4	2	t011/IVa	1	A5	0.125	1	TET-GEN-TOB-KAN	tet(L), tet(M), aph(2 ⁺)-acc(6) ⁺ , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺ , dfrS1, dfrK
C1840	Nasal-5	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT-CIP ¹ -LVX ¹	tet(L), tet(M), aph(2 ⁺)-acc(6) ⁺ , ant(4) ⁺ , aph(3) ⁺
C1841	Nasal-6	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT	tet(L), Inu(A) , dfrS1, dfrK
C1843	Nasal-7	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT	tet(L), Inu(A) , dfrK
C1845	Nasal-8	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT	tet(L), Inu(A) , dfrK
C1846	Nasal-9	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT-CIP ¹ -LVX ¹	tet(L), Inu(A) , dfrS1, dfrK
C1847	Nasal-10	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT	tet(L), Inu(A) , dfrK
C1848	Nasal-11	2	t108/V	1	B2	0.5	>128	TET-LIN-SXT	tet(L), Inu(A) , dfrK

TET, tetracycline; ERY, erythromycin; TEL, telithromycin; CLI, clindamycin; LIN, linezolid; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; CIP, ciprofloxacin, LVX, levofloxacin; ¹, intermediate. All isolates were susceptible to vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, linezolid, fosfomycin, fusidic acid, mupirocin, nitrofurantoin and rifampin. Samples: (1) first sampling period (October 2008), skin lesions and nasal samples of the patient; (2) second sampling period (January 2009), skin lesions of the patient and nasal samples of the pig.

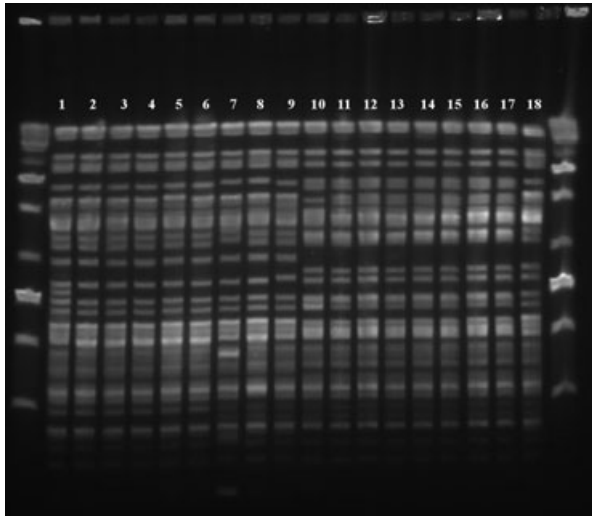


FIG. 1. PFGE patterns of chromosomal DNA digested with the *ApaI* enzyme of MRSA isolates recovered from the patient and some animals in this study. Line 1, t011 (pulsotype A2); lines 2–6, t011 (pulsotype A1); line 7, t011 (pulsotype A3); line 8, t011 (pulsotype A4); line 9, t011 (pulsotype A5); line 10, t108 (pulsotype B1); lines 11–17, t108 (pulsotype B2); line 18, t588 (pulsotype C).

late t588 to pulsotype-C (Fig. 1 and Table 1). It is important to remark that MRSA isolates typed as PFGE/A1-*spa*-t011 and PFGE/B2-*spa*-t108 were recovered both from pigs and the patient (nasal or skin lesion samples), suggesting the possible animal-to-human MRSA transmission. All *Inu(A)*-containing MRSA isolates with the erythromycin/clindamycin-susceptible and lincomycin-resistance phenotype were ascribed to the pulsotype B2.

MRSA isolates of human and animal origin were tested by PCR for the genes encoding the Panton-Valentine-leukocidin, toxic-shock-syndrome-toxin I, and exfoliative-toxin A, B and D [7,16], and negative results were obtained in all cases. The presence of PVL is not frequently found among MRSA-ST398 [17]. However, the *Inu(A)* gene has been previously detected in two MRSA PVL-positive isolates [18].

Therefore, the MRSA isolates investigated in this study were recovered from a human patient and from some pigs on his farm. Therapy with topical compounds (fusidic acid or mupirocin) might improve clinical symptoms but the efficacy could be low in people with close contact with MRSA-colonized animals [19], as is corroborated in this study. People who are in contact with pigs seem to have a significant bacterial load of MRSA [1] and can serve as a reservoir, which may have important epidemiological and clinical implications. Moreover, most pigs tested in this study (11/12, 91.7%) were MRSA-ST398 carriers. These results seem to be usual according to the high frequencies of detection recently found

among slaughter pigs in Spain [7], and also to the high frequencies revealed in farm dust samples in some European countries, such as Spain and Germany [20].

The detection of the gene *Inu(A)* in MRSA-ST398 isolates from a human and some pigs is a novel observation. This gene encodes a lincomycin-nucleotidyltransferase and confers varying levels of resistance to different lincosamides such as pirlimycin and lincomycin [21], but not to clindamycin. In our study, this gene conferred high level of lincomycin resistance, as MIC was >128 mg/L in these isolates and some isolates showed also clindamycin resistance by the presence of *erm* genes. The *Inu(A)* gene was widely spread in the farm sampled, being detected in MRSA-ST398 isolates with different *spa*-types and pulsotypes. This gene is uncommon, and it has been generally found in strains resistant to both macrolides and lincosamides [11,22]. Lincomycin has occasionally been used in the animal industry and *Inu(A)* has already been detected in methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) isolates from bovine origin [23]. However, as far as we know, it has not been reported in MRSA of the ST398 lineage.

In summary, the animal-to-human transmission of MRSA-ST398 seems evident in this study. Indistinguishable PFGE patterns and similar phenotypic and genotypic characteristics have been detected in MRSA isolates obtained from a farmer and from some of the pigs on the farm where he worked. The transmission of MRSA-ST398 isolates containing *Inu(A)* and other resistance genes between animals and humans could compromise treatment of infections caused by this microorganism. In addition, the high diversity of resistance genes harboured by most of the human and animal isolates is of great interest.

Acknowledgements

These data were presented, in part, at the XIII Annual Meeting of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Sevilla, Spain, 3-5 June 2009 and at the 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 10–13 April 2010.

Transparency Declarations

This work was partially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and FEDER. Carmen Lozano has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain; Elena Gómez-Sanz has a fellowship from the Gobierno de la Rioja of Spain. There are no conflicts of interest.

References

1. 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.
2. Potel C, Alvarez-Fernández M, Constenla L, Alvarez P, Perez S. First human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 351–352.
3. Pomba C, Baptista FM, Couto N, Loução F, Hasman H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates with indistinguishable Apal restriction patterns in colonized and infected pigs and humans. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2479–2481.
4. Smith TC, Male MJ, Harper AL et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE* 2008; 4: e4258.
5. Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Empyema due to MRSA ST398 in Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 138–140.
6. 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* 2010; doi: 10.1093/jac/dkq365.
7. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C et al. 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.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement*. CLSI Document M100-S18. Wayne, PA: CLSI, 2009.
9. 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>.
10. 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.
11. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1062–1066.
12. Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S et al. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1156–1164.
13. 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: 5442–5448.
14. 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.
15. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–2239.
16. Yamaguchi T, Nishifuji K, Sasaki M et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect Immun* 2002; 70: 5835–5845.
17. Yu F, Chen Z, Liu C et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Pantone–Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalized patients in China. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 381–384.
18. Monecke S, Berger-Bächi B, Coombs G et al. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Pantone–Valentine leukocidin. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 236–249.
19. Lozano C, Aspiroz C, Lasarte JJ, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. 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* 2010; doi: 10.1016/j.cimid.2010.06.006.
20. 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 European Food Safety Authority. *EFSA Journal* 2009; 7: 1376.
21. Lütjhe P, von Köckritz-Blickwede M, Schwarz S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 600–606.
22. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodríguez F et al. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 94: 199–206.
23. Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehrlich R. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol* 2007; 125: 128–140.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina ST398 en pacientes con infecciones cutáneas y sus familiares

Carmen Aspiroz^{a,*}, Carmen Lozano^b, Yolanda Gilaberte^c, Myriam Zarazaga^b, M. José Aldea^a y Carmen Torres^b

^a Unidad de Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, España

^b Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España

^c Servicio de Dermatología, Hospital San Jorge, Huesca, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de marzo de 2011

Aceptado el 25 de julio de 2011

On-line el 17 de noviembre de 2011

Palabras clave:

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus resistente a metilicina

Secuencia tipo 398

Tetraciclina

Cerdos

Infecciones de piel y partes blandas

RESUMEN

Introducción: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) ST398 es una línea genética asociada con ganado que puede causar infecciones en humanos.

Métodos: Se presentan 4 casos de lesiones cutáneas por SARM ST398 en 3 pacientes, dos de ellos trabajadores de granja de cerdos. Asimismo, se estudió el estado de portador nasal de los pacientes y sus familiares convivientes. Las cepas SARM fueron tipadas (SCCmec, spa, agr y MLST) y se determinó su fenotipo y genotipo de resistencia a antimicrobianos y la presencia de genes de virulencia.

Resultados: Se aislaron 20 cepas SARM ST398 de lesiones de 3 pacientes y de muestras nasales de 2 pacientes y 5 familiares. Los aislados se tiparon: spa-tipo t011 o t108; agr-tipo I y SCCmec IVa o V. Las cepas fueron todas resistentes a tetraciclina y 15 de ellas presentaron un fenotipo de multiresistencia, pero no genes de virulencia.

Conclusiones: SARM ST398 está emergiendo en nuestro medio, frecuentemente asociado a infección de piel y partes blandas en individuos con relación profesional con granjas de cerdos. La resistencia a tetraciclina es un marcador importante para la detección de estas cepas.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Molecular characterisation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains ST398 in patients with skin infections and their relatives

ABSTRACT

Introduction: Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) of sequence type ST398 is a genetic lineage also described in human infections.

Methods: Cutaneous infections related with MRSA ST398 are described in 3 patients, two of them pig farmers. The MRSA nasal carriage of patients and their relatives was also studied. MRSA ST398 strains were typed (SCCmec, spa, agr and MLST) and the antimicrobial resistance pattern and virulence genes were determined.

Results: Twenty MRSA ST398 isolates were recovered in lesions of three patients, and in nasal samples of two patients and five relatives. Isolates were typed: spa-type t011 or t108; agr-type I and SCCmec IVa or V. MRSA strains were tetracycline-resistant and 15 of them showed a phenotype and genotype of multi-resistance, but they were free of tested virulence genes.

Conclusions: LA-MRSA ST398 is an emergent problem in our country, mainly associated with skin and soft tissue infections in people with professional relationships with pig farms. Tetracycline resistance is an important marker for MRSA ST398 detection.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Staphylococcus aureus

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Sequence Type 398

Tetracycline

Pigs

Skin and soft tissue infections

Introducción

En la década pasada, las cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistentes a metilicina adquiridas en la comunidad (SARM-CO) fueron un problema creciente en los EE. UU., hasta

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carmenaspiroz@gmail.com (C. Aspiroz).

representar en la actualidad una epidemia y constituir el agente etiológico de la mayoría de las infecciones de piel y partes blandas (IPPB) de ese país¹. La prevalencia de SARM-CO en Europa no ha seguido el mismo patrón y continúa siendo baja, aunque es objeto de estrecha vigilancia. Se han detectado casos de SARM-CO en la práctica totalidad de los países europeos incluyendo Holanda y los países nórdicos que, como ya es conocido, presentan tasas muy bajas de SARM-hospitalario. No obstante, se aproximan peligrosamente a las cifras de EE.UU.². En contraste con América del Norte, donde el clon USA300 (ST8-IV) es el predominante, los SARM-CO en Europa se caracterizan por una heterogeneidad clonal y las cepas más comunes pertenecen al llamado clon Europeo (ST80-IV), aunque los aislados de USA300 están aumentando.

Algunos de los clones de SARM-CO que están emergiendo en Europa están relacionados con los animales, especialmente con los cerdos. Este fenómeno se ha estudiado sobre todo en países como Holanda, Alemania o Dinamarca: es el llamado SARM asociado al ganado (SARM-AG) que incluye principalmente cepas pertenecientes a la línea clonal 398 (ST398) y de origen porcino^{3–5}. Este tipo de cepas también se ha detectado en nuestro país^{6,7}, y generalmente las cepas son resistentes a tetraciclina (TET^R). El conocimiento de la epidemiología de estos nuevos SARM es esencial para implementar nuevas iniciativas de control que prevengan su potencial diseminación en Europa².

Relatamos la evidencia de 4 casos de infecciones cutáneas comunitarias relacionadas con SARM ST398 en 3 pacientes, dos de ellos con contacto profesional con ganado porcino, realizándose la caracterización y tipado molecular de las cepas, el estudio del fenotipo y genotipo de resistencia a antimicrobianos y su posible repercusión, tanto clínica como epidemiológica.

Métodos

Detección de los casos clínicos

Se estudiaron durante un período de 3 años (1 de junio 2008–1 de junio 2011) las muestras procedentes de cultivos dermatológicos, piel y tejidos blandos y exudados procedentes de consultas externas de Dermatología y Urgencias del Hospital Royo Villanova de Zaragoza. En este intervalo se aisló *S. aureus* en 121 pacientes, y en 15 de ellos se identificó SARM, siendo 10 de los casos considerados SARM-CO y en 6 de ellos las cepas presentaban el fenotipo TET^R. Las cepas de los 6 pacientes con SARM-TET^R fueron tipadas como ST398, describiéndose en este estudio los datos clínicos relacionados con 3 de estos pacientes, ya que otros han sido publicados con anterioridad^{6,7}.

Casos y pacientes

Se incluyeron en este estudio 4 casos de 3 pacientes con lesiones cutáneas:

Caso A Paciente 1

Mujer de 45 años de edad, trabajadora de una granja de cerdos, con antecedentes personales dermatológicos de eccema. El motivo de consulta fue una lesión en el cuello, consistente en una placa eritematosa y pruriginosa.

Caso B Paciente 2

Varón de 46 años de edad, trabajador de una granja de cerdos. Consultó por una paroniquia intensa en varios dedos de las manos de largo tiempo de evolución. Había sido tratado con antifúngicos tópicos y orales con resultados poco satisfactorios.

Caso C Paciente 2

El mismo paciente del caso B, un año después de consultar por las lesiones ungueales, consultó por una nueva lesión de tórpida cicatrización en la cara, de varias semanas de evolución.

Caso D Paciente 3

Mujer de 48 años de edad que acudió al servicio de urgencias del hospital por presentar exudado ótico y dolor local. Entre sus antecedentes refería eccema de conducto auditivo externo de años de evolución. La paciente no tenía relación con ganado ni con animales domésticos.

Obtención de muestras e identificación y caracterización de las cepas

En las lesiones de los 4 casos presentados se obtuvo un cultivo abundante de estafilococos que fueron identificados como *S. aureus*. La resistencia a oxacilina y el patrón de resistencia a otros 18 antimicrobianos fue determinada mediante microdilución (paneles comercializados Vitek2, BioMérieux) y difusión en agar. Se realizó la caracterización genética de las cepas SARM (MLST, tipado de *spa*, *agr* y *SCCmec*), el estudio de factores de virulencia (*lukS-PV/lukF-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*) y de genes de resistencia a antimicrobianos (*mecA*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *ant(4')*, *aph(2'')-acc(6')*, y *dfrK*) mediante PCR y secuenciación⁶.

Una vez conocida la identificación definitiva, se instó a los pacientes a volver al laboratorio de Microbiología, exudado óptico, probablemente por estar bajo tratamiento antimicrobiano, y se tomaron frotis nasales para conocer el estado de portador. En el caso B, el paciente 2 fue visitado en varias ocasiones para ver su evolución y en cada una de ellas se recogieron muestras de sus lesiones y frotis nasales. Se obtuvieron asimismo hisopados nasales de los familiares que convivían con los pacientes. Las cepas SARM caracterizadas y tipadas como se ha comentado anteriormente.

Resultados

Las características de las cepas aisladas de las lesiones en cada caso y de los frotis nasales de pacientes y familiares se muestran en la tabla 1 (una cepa por muestra, total: 20 cepas SARM). Como puede observarse, en las muestras de los 4 casos se aisló SARM ST398, y los pacientes 1 y 2 fueron asimismo portadores nasales. Los tipos *spa* detectados en las cepas clínicas y nasales de los pacientes fueron t011 (mayoritario) y t108. También se aislaron cepas SARM ST398 pertenecientes a los *spa*-tipos t011 y t108 en muestras nasales de 5 familiares de los pacientes 2 y 3 (tabla 1). Es interesante reseñar que en el paciente 2 se detectaron cepas con *spa*-tipo t011 y t108 en las lesiones, y asimismo, ambos tipos *spa* fueron detectados en las muestras nasales de los convivientes.

Todas las cepas de pacientes y convivientes presentaron resistencia a tetraciclina y portaban diferentes combinaciones de los genes *tetM*, *tetL* y *tetK*. Las cepas procedentes de los pacientes 1 y 2 mostraron un fenotipo de multiresistencia con una gran diversidad de genes de resistencia; sin embargo, las cepas del paciente 3 (caso D) solo presentaron resistencia a tetraciclina, además de a oxacilina (tabla 1). Todas las cepas SARM del estudio fueron negativas para los genes de virulencia analizados (*lukS-PV/lukF-PV*, *tst*, *eta*, *etb* y *etd*).

Discusión

SARM ST398 fue descrito por primera vez en 2005 en países del centro de Europa³. Se relaciona con animales de producción y en

Tabla 1

Características de las 20 cepas de SARM ST398 aisladas a partir de los 4 casos de infecciones cutáneas de los pacientes y los frotis nasales de los 3 pacientes y sus familiares

Caso-paciente	Cepa	Origen cepa	Fecha	Tipo de SCCmec	MLST/spa	agr	Fenotipo de Resistencia ^a	Genotipo de Resistencia	Cambio aminoacídico en:	
									GrlA	GyrA
A-1	C1992	Lesión cutánea paciente	Junio-2009	IVa	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, GM, TOB, KAN	<i>mecA, tetL, tetM, ermA, ermC, msrA, ant(4')</i> , <i>aph(2')-acc(6')</i>	-	-
	C1993	Muestra nasal paciente	Junio-2009	IVa	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, GM, TOB, KAN	<i>mecA, tetL, tetM, ermA, ermC, msrA, ant(4')</i> , <i>aph(2')-acc(6')</i>	-	-
B-2	C2353	Lesión piel/uña 3- ^a dcha paciente	Julio-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, CIP, LEV, SXT	<i>mecA, tetK, tetL, tetM, ermB, dfrK</i>	S84L	S80F
	C2349	Lesión piel/uña 3 izda paciente	Julio-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, CIP, LEV, TOB, SXT	<i>mecA, tetK, tetL, tetM, ermB, dfrK, ant(4')</i>	S84L	S80F
	C2352	Lesión piel/uña 4 izda paciente	Julio-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, CIP, LEV	<i>mecA, tetK, tetL, tetM, ermB</i>	S84L	S80F
	C2350	Muestra nasal paciente	Julio-2009	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, TOB	<i>mecA, tetL, ermB, ermC, ant(4')</i>		
	C2358	Muestra nasal Padre	Agosto-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	<i>mecA, tetK, tetM, ermB, ermC</i>	NR	NR
	C2362	Muestra nasal Madre	Agosto-2009	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, CLI	<i>mecA, tetM</i>	-	-
	C2363	Muestra nasal Hermano-1	Agosto-2009	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI	<i>mecA, tetM, ermC</i>	-	-
	C2364	Muestra nasal Hermano-2	Agosto-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI	<i>mecA, tetK, tetM, ermC</i>	-	-
	C2365	Muestra nasal Hermano-2	Agosto-2009	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, TOB ¹	<i>mecA, tetL, tetM, ermC, ant(4')</i>	-	-
	C2366	Lesión piel/uña 3 izda (1. ^a revisión)	Agosto-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, LEV ¹ , SXT	<i>mecA, tetK, tetL, tetM, ermA, ermB, dfrK</i>	-	-
	C2538	Lesión piel/uña 3 izda (2. ^a revisión)	Septiembre-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, CIP, LEV, SXT	<i>mecA, tetK, ermB, dfrK</i>	S84L	S80F
	C2539	Lesión piel/uña 3 dcha (2. ^a revisión)	Septiembre-2009	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, TOB	<i>mecA, tetK, teL, tetM, ermC, ant(4')</i>	-	-
	C2541	Muestra nasal paciente	Septiembre-2009	V	ST398/t011	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, CIP, LEV, SXT, TOB	<i>mecA, tetK, teL, tetM, ermB, dfrK, ant(4')</i>	S84L	S80F
	C2768	Lesión piel/uña 3 izda (3. ^a revisión)	Enero-2010	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, TOB	<i>mecA, teL, tetM, ermC, ant(4')</i>	-	-
	C2782	Lesión piel/uña 3 dcha (3. ^a revisión)	Enero-2010	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, TOB, CIP, LEV	<i>mecA, teL, tetM, ermC, ant(4')</i>	S84L	S80F
	C-2	C2875	Lesión cara paciente	Marzo-2010	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET, ERI, CLI, TOB	<i>mecA, tetL, tetM, ermC, ant(4')</i>	-
D-3	C2767	Lesión otitis externa paciente	Enero-2010	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET	<i>mecA, tetM</i>	-	-
	C2877	Muestra nasal Padre	Enero-2010	V	ST398/t108	I	OXA, FOX, TET	<i>mecA, tetM</i>	-	-

^a OXA-oxacilina, FOX-cefoxitina, TET-tetraciclina, ERI-eritromicina, CLI-clindamicina, GM-gentamicina, TOB-tobramicina, KAN-kanamicina, CIP-ciprofloxacina, LEV-levofloxacina, SXT-trimetoprim-sulfametoxazol.¹ intermedio.

especial con cerdos, siendo un riesgo también para el ser humano⁴. Desde entonces se ha aislado en otros países europeos, así como en América y Asia. En 2007, un tercio de todos los SARM en Holanda fueron ST398⁵. En otros países europeos, la situación no es bien conocida, pero la prevalencia de estas cepas en muestras ambientales de granjas de porcino se ha demostrado muy elevada en países como el nuestro, y en otros como Alemania y Bélgica⁸. Este hecho constituye un factor de riesgo para la colonización nasal y cutánea del personal en contacto con los animales, lo que puede conducir a su vez a una mayor probabilidad de infección en los portadores de estos microorganismos. Aunque, en general, las infecciones producidas por SARM-AG son de piel y tejidos blandos superficiales, como en estos casos y otros publicados⁶, no se debe bajar la guardia pues se han visto también implicados en infecciones graves como endocarditis, neumonías asociadas a ventilación mecánica, etc.^{4,9}.

Las veinte cepas de SARM ST398 de este estudio fueron aisladas de lesiones cutáneas de 3 pacientes y de la investigación de portadores nasales en los 3 pacientes y sus familiares/contactos más próximos. Dos de los 3 pacientes eran granjeros de porcino, claro criterio epidemiológico para la aparición de cepas de SARM ST398. Sin embargo, la paciente 3 no tenía relación profesional con animales, aunque su padre (con el que no convivía) sí había sido granjero de cerdos hacía 10 años. Aunque se desconoce la razón y origen de esta adquisición de SARM ST398, no se puede descartar la posibilidad de un estado prolongado de portador y transmisión interhumana.

En cuanto a la caracterización molecular de las cepas, se han detectado ST398 con dos tipos diferentes de *spa* (t011 y t108). Ambos tipos, junto con el t034 corresponden a los mayoritariamente encontrados hasta el momento^{4,7}. No obstante, según algunos trabajos recientes parece que otros tipos de *spa* se están expandiendo⁷, lo que indica una probable evolución de esta línea genética.

Por otro lado, en este estudio se han hallado dos tipos de SCCmec (IVa y V), los cuales han sido previamente detectados en SARM ST398¹⁰. Algunos autores proponen una relación entre el *spa* tipo t011 y el SCCmec IVa y entre el *spa* tipo t108 y el SCCmec V¹⁰. En nuestro estudio todas las cepas con SCCmec IVa fueron t011 pero la mayoría de las que presentaron el *spa* tipo t011 fueron SCCmec V. Este hecho ya ha sido observado en otros estudios¹¹.

La mayoría de los aislados SARM ST398 presentaron fenotipo de multiresistencia. Se han detectado una gran diversidad de genes de resistencia a tetraciclina (*tetL*, *tetM* y/o *tetK*), macrólidos y lincosamidas (*ermA*, *ermB* y *ermC*), aminoglucósidos (*ant[4']*) y trimetoprim (*dhfrK*); siendo este último gen descrito por primera vez en una cepa de SARM ST398¹². Los aislamientos de SARM-AG suelen ser sensibles a la mupirocina y al ácido fusídico lo que facilita el tratamiento de infecciones cutáneas con estos antimicrobianos.

Todas las cepas incluidas en este estudio fueron negativas por PCR para las toxinas estudiadas, incluida la leucocidina de Pantón-Valentine. Es conocido que SARM-AG tiene menos factores de patogenicidad que otros SARM de diferentes líneas genéticas¹³, aunque se han descrito algunas cepas ST398 positivas para la leucocidina de Pantón-Valentine, tanto en SARM como en SASM¹⁴.

Todos los SARM ST398 del estudio fueron resistentes a la tetraciclina, y esta característica es común a esta línea genética, por lo que puede ser un buen marcador inicial de sospecha en aislados de *S. aureus* implicados en IPPB, especialmente si existe relación profesional con animales,^{4,6-8}. De hecho, en nuestro estudio, todos los aislados de SARM comunitarios TET^R procedentes de lesiones de piel y tejidos blandos fueron ST398, y en 5 de 6 pacientes existía el antecedente epidemiológico de contacto estrecho y reiterado con ganado porcino. En este sentido, podría ser pertinente la inclusión

de una pregunta en la historia clínica sobre el posible contacto profesional del paciente con animales en aquellos casos de sospecha epidemiológica de SARM ST398.

Por último, este estudio constata la peculiar ecología de *S. aureus* en los pacientes que están en contacto próximo con ganado porcino y sería recomendable extremar las medidas de higiene y protección en las granjas. En nuestro ámbito, aquellos casos en los que se encontraron cepas de SARM-AG en lesiones cutáneas se asociaron generalmente con colonizaciones nasales y con un patrón de resistencia múltiple que incluía tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, y ocasionalmente quinolonas y cotrimoxazol, lo que hace su tratamiento difícil sin la guía de un cultivo y un estudio de sensibilidad. Asimismo, pensamos que, de igual modo que ya sucede en otros países como Holanda, la relación profesional de los pacientes con el ganado –especialmente porcino– debería añadirse a los habituales factores de riesgo para estar colonizado por SARM.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto SAF2009-08570 del Ministerio de Ciencia e Innovación y Feder. Carmen Lozano tiene una beca predoctoral del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

Bibliografía

- Edelsberg J, Taneja C, Zervos M, Haque N, Moore C, Reyes K, et al. Trends in US hospital admissions for skin and soft tissue infections. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1516–8.
- Otter JA. Molecular Epidemiology of CA-MRSA in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:227–39.
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1965–6.
- Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:255–8.
- Huijsdens XW, Bosch T, Van Santen-Verheul MG, Spalburg E, Pluister GN, Van Luit M, et al. Molecular characterization of PFGE non-typable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands, 2007. *Euro Surveill.* 2009;14, pii: 19335.
- Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, Torres C. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:157–9.
- Lozano C, Aspiroz C, Charlez L, Gómez-Sanz E, Toledo M, Zarazaga M, et al. Skin lesion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398-t1451 in a Spanish pig farmer: possible transmission from animals to humans. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:605–7.
- 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 Journal.* 2009;7:1376.
- Ekkelenkamp MB, Sekkat M, Carpaïj N, Troelstra A, Bonten MJ. Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2006;150:2442–7.
- Morgan M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1181–7.
- Argudín MA, Fetsch A, Tenhagen BA, Hammerl JA, Hertwig S, Kowall J, et al. High heterogeneity within methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and *spa* and SCCmec types. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:652–8.
- Kadlec K, Schwarz S. Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes *erm(T)*, *dhfrK*, and *tet(L)* in a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:915–8.
- 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.* 2010;17:316–9.
- Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Öberg S, Karlsson L, Åhrén C. Infection with Pantón-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1271–2.

Skin Lesion by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398-t1451 in a Spanish Pig Farmer: Possible Transmission from Animals to Humans

Carmen Lozano,¹ Carmen Aspiroz,² Luis Charlez,³ Elena Gómez-Sanz,¹ Miguel Toledo,² Myriam Zarazaga,¹ and Carmen Torres¹

Abstract

Skin lesions by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of the lineage ST398-t1451 were detected in a pig-farmer in Spain in 2010. Similar MRSA ST398-t1451 strains were also detected in nasal samples from the patient, his brother, and nine pigs from his farm. All human and animal strains were ascribed to the SCC_{mec} type V and the *agr* type I, showed tetracycline-erythromycin-clindamycin resistances, and harbored the *tetK*, *tetM*, and *ermC* resistance genes. They were negative for all tested toxin genes (*lukS/lukF*, *tst*, *eta*, *etb*, and *etd*). All human and animal strains showed closely related pulsed-field gel electrophoresis-*ApaI* patterns. Possible MRSA transmission from animals to humans is suggested.

Key Words: *Staphylococcus*—Surveillance—Transmission—Zoonosis.

Introduction

METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a global problem that affects both hospitalized and community population. In the last years, a livestock-associated clonal lineage of MRSA, of sequence-type ST398, has emerged first in animals, and later either colonizing or causing infections in humans, especially in people in contact with pigs (van Loo et al. 2007, Lewis et al. 2008). Since its first detection in 2005 (Voss et al. 2005), the number of human infections caused by MRSA ST398 has been increasing steadily, being associated in most cases to skin and soft-tissue infections, although serious infections by this microorganism have been also reported (Witte et al. 2007, Lewis et al. 2008, Mammina et al. 2010, Lozano et al. 2011). The aim of this study was to perform the genetic characterization of the MRSA strains recovered from a patient with folliculitis, from his brother, and from pigs of the farm where both individuals worked, to determine the possible MRSA transmission from animals to humans.

Materials and Methods

A 30-year-old patient, who worked in a pig-farm in Spain, presented a severe folliculitis on his face. He had been pre-

viously treated with tetracycline due to an adverse evolution of acne. Samples were taken from the lesions of the patient (March 4th, 2010) by skin scraping and by follicle puncturing and they were cultured on oxacillin-resistant *S. aureus* agar media (Oxoid), colistin nalidixic acid (bioMérieux), and blood agar media (Oxoid). The presence of MRSA was confirmed in the samples by classical microbiological methods as well as by detection of *nuc* and *mecA* genes by polymerase chain reaction (PCR) (Gómez-Sanz et al. 2010). In addition, a mycological study was performed with the patient samples. New samples of the patient (from lesions and nasal swabs) and nasal swabs of his brother (a healthy person who worked in the same pig-farm) and of his parents (who did not work in the farm) were obtained 1 week later (March 11th, 2010), and were cultured as previously indicated. One isolate per positive sample was further characterized. Topical and oral treatments of the patient with fusidic acid and nasal treatment with mupirocin were administered.

Four weeks later, the patient's clinical situation improved and new nasal swabs and samples from skin (by skin scraping) were collected (April 8th, 2010). Nasal samples from nine pigs of the farm were randomly screened (March 11th, 2010) and tested for MRSA recovery. Animal nasal swabs were inoculated into brain heart infusion broth (Difco) containing 6.5% NaCl and incubated at 35°C for 24 h. Then, 100 μ L was

¹Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

²Unidad de Microbiología and ³Unidad de Dermatología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain.

seeded on oxacillin-resistance screening agar base plates (Oxoid) with oxacillin (2 mg/L), and incubated at 35°C for 36 h. One MRSA colony per sample was selected and identified by biochemical and molecular methods (Gómez-Sanz et al. 2010).

All human and animal MRSA strains were tested for susceptibility to 20 antimicrobial agents (penicillin, oxacillin, cefoxitin, erythromycin, clindamycin, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, tobramycin, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, cotrimoxazole, vancomycin, teicoplanin, mupirocin, linezolid, fosfomycin, nitrofurantoin, fusidic acid, and rifampin) by using the VITEK-2 system (bioMérieux), except for kanamycin for which the disk-diffusion method was used (CLSI 2008).

The presence of genes that confer resistance to beta-lactams (*mecA*), tetracycline (*tetK*, *tetL*, *tetM*, and *tetO*), and macrolide/lincosamides (*ermA*, *ermB*, *ermC*, and *msrA*) was analyzed by PCR (Gómez-Sanz et al. 2010). All MRSA strains were characterized by multilocus-sequence-typing, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE, with *ApaI* enzyme), determination of SCC*mec*-type, *agr*-type, and *spa*-type. Presence of the genetic determinants of Panton-Valentine-Leukocidin (*lukS/lukF*), Toxic-Shock-Syndrome-Toxin 1 (*tst*), and Exfoliative-Toxin A (*eta*), B (*etb*), and D (*etd*) was analyzed by PCR (Gómez-Sanz et al. 2010).

Results

Gram-positive cocci in the presence of polymorphonuclear leukocytes were detected in samples of skin lesions of the patient that were taken in March 4th and 11th, and they were identified as MRSA. The mycological study of these samples was negative. MRSA strains were also obtained from nasal samples of the patient and of his brother but not from those of their parents (March 11th). Four MRSA strains were kept for further study: two strains from positive skin samples of the patient (obtained in March 4th and 11th), one from the nasal sample of the patient and the other from the nasal sample of his brother.

No MRSA strains were recovered from skin lesion or nasal samples of the patient after treatment with mupirocin and fusidic acid (April 8th).

In addition, MRSA were obtained from nasal samples of the nine tested pigs and one strain per animal was further studied. All four human and nine animal MRSA strains presented identical phenotypic and genotypic characteristics. All strains showed resistance to erythromycin, clindamycin, and tetracycline and diminished susceptibility to levofloxacin; they showed susceptibility to the other tested antimicrobials. The *mecA*, *tetK*, *tetM*, and *ermC* resistance genes were detected in all MRSA strains.

The 13 MRSA strains of human and animal origin were typed as ST398, *spa*-type t1451, SCC*mec*-type V, and *agr*-type I. They were negative for all tested toxin genes (*lukS/lukF*, *tst*, *eta*, *etb*, and *etd*). Moreover, all MRSA isolates were analyzed by PFGE using *ApaI* restriction enzyme and all of them showed closely related patterns, with five subtypes (A1–A5) that differed in only one to three bands (Fig. 1).

Discussion

The phenotypic and genotypic similarity of the MRSA strains of human and animal origin detected in this study

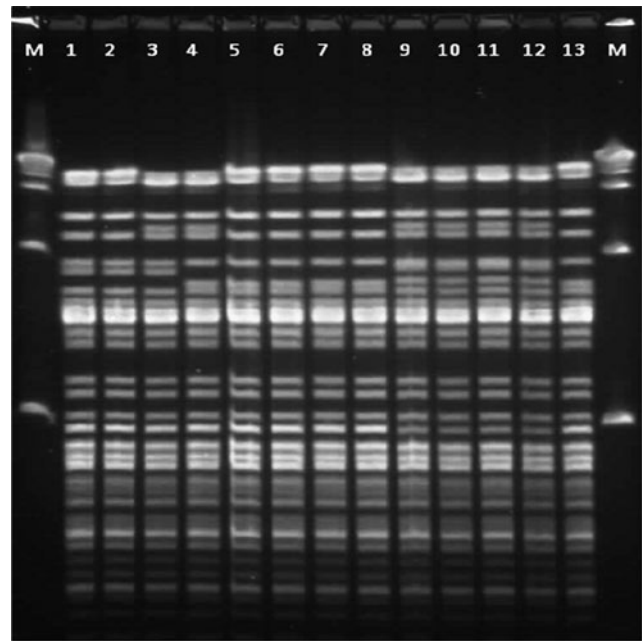


FIG. 1. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of chromosomal DNA digested with *ApaI* enzyme of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from humans and animals in this study. M, lambda pulse marker; lanes 1 and 2, isolates from the skin lesions in two samples taken with 1 week of difference (subtype A1); lane 3, isolate from the nasal sample of the patient (subtype A2); lane 4, isolate from the nasal sample of the brother (subtype A3); lanes 5–8 and 13, isolates from the nasal samples of the pigs (subtype A4); lanes 9–12, isolates from the nasal samples of the pigs (subtype A5).

indicates the wide dissemination of this clone in the studied pig-farm given that all nine tested pigs and two workers were colonized by the same MRSA clonal lineage. MRSA ST398-t1451 lineage had been previously detected in samples from pigs or from people in contact with animals (EFSA 2009, Köck et al. 2009, Lozano et al. 2011). The *spa*-types most frequently identified among MRSA ST398 had been t011, t034, and t108 (Witte et al. 2007, van Belkum et al. 2008), although it seems that other *spa*-types may be spreading (EFSA 2009, Gómez-Sanz et al. 2010). Although the *spa*-type t1451 has been detected in some patients (Köck et al. 2009) it does not seem to be more virulent than other ST398 strains since we have not detected *lukS/lukF*, *tst*, *eta*, *etb*, and *etd* toxin genes among isolates of this lineage. Moreover, the brother of the patient was positive for MRSA ST398-t1451, but did not show any infection.

The acne is a multifactorial skin disease and sometimes the antimicrobial therapy is not enough for the improvement of the patient. In this case the clinical picture was notably improved with the therapy chosen: fusidic acid (topical and oral) and decolonization with nasal mupirocin. Notably, the patient had been previously treated with tetracycline when a severe folliculitis on his face was detected. It is possible that another microorganism could have caused the infection, after which a superinfection by MRSA ST398 t1451 happened, being stimulated by the tetracycline treatment. The MRSA strains isolated from the lesions after this treatment showed

resistance to this antibiotic. The strains presented two different tetracycline resistance genes, *tetK*, and *tetM*. The *tetK* gene confers resistance to tetracycline but not to minocycline; *tetM* gene confers resistance to all antibiotics of the tetracycline group (Schmitz et al. 2001). The combination of these genes has been previously reported and has been shown to be more commonly found in MRSA strains than in methicillin-resistant *S. aureus* strains (Schmitz et al. 2001).

All our MRSA strains were resistant to macrolides and clindamycin and they harbored the *ermC* gene. The *ermA* and *ermC* genes are the most prevalent MLS_B resistance genes detected in *S. aureus*. High prevalence of *ermC* gene among MRSA ST398 has also been found in other studies (Denis et al. 2009).

In summary, MRSA ST398-t1451 has been associated with severe folliculitis lesions, and strains with identical phenotypic and genotypic characteristics and with closely related PFGE profiles have been identified in nasal swabs of the patient and of his brother, and in nasal swabs of all the studied pigs of the farm. These results suggest the animal-to-human transmission of MRSA ST398 strains and indicate the capacity of spread of this microorganism among individuals with close contact with these MRSA-colonized animals.

Acknowledgments

This work was supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and FEDER. C. Lozano has a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and E. Gómez-Sanz a fellowship from the Gobierno de La Rioja, Spain.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement*. CLSI Document M100-S18. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- Denis, O, Suetens, C, Hallin, M, Catry, B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1098–1101.
- [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* 2009; 7:1376.
- Gómez-Sanz, E, Torres, C, Lozano, C, Fernández-Pérez, R, et al. 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; 10:1269–1277.
- Köck, R, Harlizius, J, Bressan, N, Laerberg, R, et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:1375–1382.
- Lewis, HC, Molbak, K, Reese, C, Aarestrup, FM, et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1383–1389.
- Lozano, C, Aspiroz, C, Ezpeleta, AI, Gómez-Sanz, E, et al. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile. Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:138–140.
- Mammaia, C, Calà, C, Plano, MR, Bonura, C, et al. Ventilator-associated pneumonia and MRSA ST398, Italy. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:730–731.
- Schmitz, FJ, Krey, A, Sadurski, R, Verhoef, J, et al.; European SENTRY Participants. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* strains. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:239–2340.
- van Belkum, A, Melles, DC, Peeters, JK, van Leeuwen, WB, et al. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:479–483.
- van Loo, I, Huijsdens, X, Tiemersma, E, de Neeling, A, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1834–1839.
- Voss, A, Loeffen, F, Bakker, J, Klaassen, C, Wulf, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1965–1966.
- 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.

Address correspondence to:

Carmen Torres
 Área Bioquímica y Biología Molecular
 Universidad de La Rioja
 Madre de Dios 51
 Logroño 26006
 Spain

E-mail: carmen.torres@unirioja.es

Empyema caused by MRSA ST398 with Atypical Resistance Profile, Spain

To the Editor: We report a case of empyema caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type ST398 in a 79-year-old man in Spain who had severe chronic obstructive pulmonary disease. In 2009, the patient was hospitalized in the intensive care unit because of decompensation of his chronic obstructive pulmonary disease, profound iliofemoral venous thrombosis, right pneumothorax, and lung carcinoma. Thoracic drainage, support measures, and intravenous levofloxacin were initiated, but no clinical improvement was seen. Purulent exudates from the thoracic drainage tube and of a tracheal aspirate were cultured. MRSA was isolated from both samples and from a nasal swab. Antimicrobial drug therapy was changed from levofloxacin to intravenous linezolid, but the patient's clinical situation rapidly worsened, and he died of multiorgan failure.

The 3 MRSA isolates were typed (multilocus sequence typing-, *spa*-, staphylococcal cassette chromosome [SCC] *mec*-, and *agr*-typing, in addition to pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]), likewise, the antimicrobial drug-resistance phenotypes and genotypes, and virulence genes were determined (1,2). All 3 MRSA isolates were typed as sequence type (ST) 398, *spa*-type t011, SCC*mecV*, and *agrI*. The 3 isolates had the same resistance phenotype, including to β -lactams, tetracycline, clindamycin (but not erythromycin), ciprofloxacin, and levofloxacin. We confirmed the presence of *mecA*, *tetM*, *tetK*, and *vga(A)* genes by PCR and sequencing; however, PCRs for *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)*, *cfr*, *vga(C)*, *lsa(B)*, and *tetL* genes were negative. Primers used for detection of *vga(A)*

gene were F-5'-GAAACTCTTATTC GAACYATTCTAGC-3' and R-5'-GGTTCAATACTCAATCGACTGAG-3'. Specific amino acid changes in the quinolone-determining region of GyrA and ParC proteins (S84L and S80F, respectively) were detected by PCR and sequencing (1). All 3 MRSA isolates were negative by PCR for the Pantone-Valentine leukocidin, toxic shock syndrome toxin 1, and exfoliative toxins A and B.

The patient lived with his wife and 2 sons near a pig farm. Both sons worked on the farm; the patient, but not his wife, helped sporadically on the farm. Nasal samples from the 3 family members indicated MRSA carriage in 1 son but not in the other son or the patient's wife. The characteristics of the nasal MRSA strain recovered from the son were identical to those previously detected in MRSA strains from the patient (Table). In addition, nasal swabs from 18 pigs on the farm were randomly taken, and MRSA isolates were detected in 9 (50%) pigs; 1 MRSA isolate per animal was further characterized. Eight isolates were typed as ST398/t011/SCC*mecV*/*agrI*, and the remaining one as ST398/t1451/SCC*mecV*/*agrI*. All animal isolates had the same resistance phenotype and genotype as the MRSA isolates from the patient and son. None harbored the studied virulence factors (Table). All isolates had an unusual clindamycin-resistance/erythromycin-susceptibility phenotype and harbored the *vga(A)* gene.

We analyzed all MRSA isolates of human and animal origins by *Apal*-PFGE (2) and compared patterns as previously recommended (3). Only 1 pulsotype (A) and 3 closely related subtypes were identified (A1, A2, and A3). One MRSA isolate obtained from pleural fluid of the patient, 2 isolates from nasal swabs (patient and son), and most isolates from animals showed the same PFGE pulsotype and subtype (A1). Alternatively, 1 MRSA isolate from bronchial aspirate of the

patient and 2 isolates from animals showed closely related patterns (subtypes A2 and A3).

Other studies have suggested clonal spread and transmission of MRSA ST398 between pigs and persons who work with them (4,5). This microorganism has been generally associated with skin and soft tissue infections in humans (6). Nevertheless, severe infections by ST398 also have been sporadically described, and the report of 7 pneumonia cases associated with mechanical ventilation in central Europe is relevant (7). In general, ST398 isolates have fewer virulence factors than do other clones of MRSA (2); nonetheless, human infections from Pantone-Valentine leukocidin-positive ST398 isolates have been reported (8). The immunocompromised status of patients in intensive care units could favor dissemination of ST398 in this environment.

MRSA ST398 implicated in the described empyema was resistant to the first-line antimicrobial agent used for treatment (levofloxacin, MIC 4 mg/L) that was associated with amino acid changes in GyrA and ParC proteins, which could have accelerated the deteriorating evolution of the patient's respiratory infection. The atypical clindamycin-resistance/erythromycin-susceptibility phenotype detected in our human and animal MRSA strains is infrequently detected in clinical MRSA isolates from humans. Nevertheless, this phenotype might be emerging among livestock MRSA isolates, as we and others (9,10) have observed. The *vga(A)* gene detected in these isolates could be responsible for this resistant phenotype, as has been recently reported by others (10).

In conclusion, we report potential pig-to-human transmission of MRSA ST398. MRSA ST398 can be associated with severe respiratory pathology in immunocompromised patients, and these microorganisms could also be resistant to other first-line antimicrobial agents, such as fluoroquino-

Table. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from humans and animals, Spain, 2009*

Strain	Origin	SCCmec type	MLST/spa type	agr	PFGE	Antimicrobial resistance phenotype	Resistance genes detected	Amino acid change	
								GrlA	GyrA
C2355	Patient, pleural fluid	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2354	Patient, bronchial aspirate	V	ST398/t011	I	A2	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2634	Patient, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2664	Son, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2669	Pig 1, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2670	Pig 2, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2694	Pig 3, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2695	Pig 4, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2697	Pig 5, nasal swab	V	ST398/t011	I	A3	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2698	Pig 6, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2700	Pig 7, nasal swab	V	ST398/t011	I	A3	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2704	Pig 8, nasal swab	V	ST398/t011	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L
C2706	Pig 9, nasal swab	V	ST398/t1451	I	A1	OXA-CLI-TET-CIP-LEV	<i>mecA, tetK, tetM, vga(A)</i>	S80F	S84L

*All strains were susceptible to fusidic acid, fosfomicin, gentamicin, tobramycin, mupirocin, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, and tigecycline. SCC, staphylococcal cassette chromosome; MLST, multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; ST, sequence type; OXA, oxacillin; CLI, clindamycin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin.

lones, used to treat these infections. Moreover, the unusual clindamycin-resistance/erythromycin-susceptibility phenotype might be a key marker (in addition to tetracycline resistance) for the possible presence of livestock-associated MRSA.

C.L. has a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. E.G.-S. has a fellowship from the Gobierno de la Rioja of Spain. This work was partially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

**Carmen Lozano,
Carmen Aspiroz,
Ana Isabel Ezpeleta,
Elena Gómez-Sanz,
Myriam Zarazaga,
and Carmen Torres**

Author affiliations: Universidad de La Rioja, Logroño, Spain (C. Lozano, E. Gómez-Sanz, M. Zarazaga, C. Torres); and Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain (C. Aspiroz, A.I. Ezpeleta)

DOI: 10.3201/eid1701.100307

References

- Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, Torres C. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:157–9. DOI: 10.3201/eid1601.090694
- Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, et al. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:1156–64. DOI: 10.1093/jac/dkp350
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233–9.
- Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuveel MG, Heck ME, Pluister GN, et al. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006;5:26. DOI: 10.1186/1476-0711-5-26
- Morgan M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1181–7. DOI: 10.1093/jac/dkn405
- van Loo I, Huisdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Bearijlan D, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1834–9.
- Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:255–8. DOI: 10.3201/eid1302.060924
- Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Oberg S, Karlsson L, Ahren C. Infection with Pantón-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1271–2. DOI: 10.3201/eid1408.071427

9. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in mid-western U.S. swine and swine workers. PLoS ONE. 2009;4:e4258. DOI: 10.1371/journal.pone.0004258
10. 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. 2010;65:2692–3. DOI: 10.1093/jac/dkq365

Address for correspondence: Carmen Torres, Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logrono, Spain; email: carmen.torres@unirioja.es

Intensive Care Unit Admission for Pandemic (H1N1) 2009, Reunion Island, 2009

To the Editor: We report results of the prospective surveillance system established in the largest intensive care unit (ICU) of Reunion Island (25 beds). This system covers 500,000 residents (62% of the total population) and monitors the daily status of patients >17 years of age who had a positive reverse transcription–PCR (RT-PCR) for pandemic (H1N1) 2009 virus. Reunion Island is a French overseas territory in the Southern Hemisphere, with health care facilities similar to those of mainland France. Patients were followed up until discharge from the ICU or death. Data were collected during July 15–September 30, 2009.

Of 148 patients with confirmed pandemic (H1N1) 2009 infection admitted to the hospital, 13 (9%) patients (8 female) were admitted to the

ICU. These corresponded to 7% of all 187 patients admitted to the ICU during the same period. Median age was 39.4 (± 19) years (range 17–69 years). Ten patients were admitted for respiratory failure related to viral pneumonitis, 1 for pulmonary edema with severe chronic coronary insufficiency, 1 for congenital adrenal insufficiency with reversible multiple organ failure, and 1 for status epilepticus. Eleven (85%) patients had underlying concurrent medical conditions: 3 were overweight (body mass indexes 38, 32, and 29.3 kg/m²); 1 was pregnant and had asthma.

Four (31%) patients died. One was a 28-year-old woman with cerebral motor infirmity and severe chronic restrictive respiratory failure. An 18-year-old woman with aplasia after receipt of an allograft for Hodgkin lymphoma died of cerebral hemorrhage while receiving extracorporeal membrane oxygenation. A 52-year-old man admitted for pulmonary edema with severe coronary insufficiency died of multiple organ failure. A 33-year-old man with no known concurrent medical conditions died of acute respiratory distress syndrome. Time from ICU admission to death ranged from 15 to 85 days (mean 36.5 \pm 32 days). Mean age of patients who died was 32.5 \pm 14.3 years.

Chest radiographic findings were abnormal for all patients except 1, who was admitted for fever and convulsions (Huntington chorea). Bilateral pulmonary embolism was confirmed in an obese patient who survived.

Mean time between onset of clinical signs and ICU admission was 6.9 \pm 3.2 days. Mean time between admission to ICU with diagnosis confirmed by RT-PCR and initiation of antiviral treatment was 1.8 \pm 1.7 days and between illness onset and initiation of antiviral treatment, 8.8 \pm 3 days (range 4–16 days). Mean length of ICU stay was 26.3 \pm 29.3 days. Patients remained in the ICU for a total of 201 bed-days (402 per million resi-

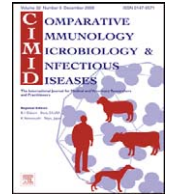
dents). The maximum daily occupancy of the ICU was 10 beds per million residents.

Five patients received steroids for severe hypotension or asthma-like clinical illness. Severe hypotension developed in 5 patients, and they received vasopressors. No patient received intravenous immunoglobulins. Ten (77%) patients required mechanical ventilation for a median of 11.5 \pm 12.2 days. One patient required high-frequency ventilation, 3 required extracorporeal membrane oxygenation, and 1 required hemodialysis. Multiple organ failure developed in 3. All patients were empirically given antibacterial drugs. Secondary infections were either documented or strongly suspected for 5 patients.

All patients received oral oseltamivir beginning 4–16 days after illness onset and continuing for 2–17 days (mean 7.2 \pm 4.3). Zanamivir was administered 1 time by inhalation through the ventilator. Viral loads in respiratory specimens ranged from 4 \times 10³ to 6.9 \times 10⁷ copies/mL (mean 1.4 \times 10⁵). Two patients excreted virus in their bronchoalveolar lavage specimens for a prolonged time (14 days).

The most prominent biological findings were elevated serum levels of procalcitonin, C-reactive protein, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase, and creatine kinase. Eight patients had lymphopenia (<1,200 cells/mm³).

Our findings are consistent with findings of other studies of severe or fatal viral pneumonia in younger patients than are usually affected in a normal influenza season (1–4), particularly in patients with concurrent medical conditions. In our study, the 3 overweight patients survived. Obesity is associated with increased severity of illness, but not always with death, in critically ill patients (5). We confirm that previously healthy young persons can die of pandemic (H1N1) 2009, although at a much lower rate than those infected in the initial outbreaks



Dynamic of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and ST1 after mupirocin treatment in a family in close contact with pigs

Carmen Lozano^a, Carmen Aspiroz^b, Juan J. Lasarte^c, Elena Gómez-Sanz^a, Myriam Zarazaga^a, Carmen Torres^{a,*}

^a Area Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

^b Laboratorio Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain

^c Pediatría, Centro Salud de Zuera, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2010

Accepted 25 June 2010

Keywords:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Mupirocin

Pigs

ST398

ST1

ABSTRACT

Nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was evaluated after a mupirocin treatment in a family previously colonized by MRSA sequence type ST398 and ST1, who lived close to a pig farm. Eight nasal samples were swabbed from each of the four family members on different moments after mupirocin treatment. The efficacy of treatment was low in those family members who worked in the farm, and higher in the remaining two family members with sporadic contact with pigs. In addition, nasal and skin swabs from randomly selected pigs of the farm were taken. MRSA were detected in 33% of pigs tested. All MRSA isolates obtained were characterized by Staphylococcal-Cassette-Chromosome *mec* (SCC*mec*) determination, Multilocus-Sequence-Typing (MLST), *spa*- and *agr*-typing, Pulsed-field-gel-electrophoresis (PFGE), antimicrobial susceptibility, detection of antimicrobial resistance genes, and toxin gene profiling. *Spa*-types t011, t1255 and t1197 were detected in humans and animals, with indistinguishable PFGE patterns, suggesting animal to human MRSA transmission. Each *spa*-type was ascribed to a specific pulsotype. *Spa*-types t127 and t108 were only detected in MRSA isolates obtained from humans, and t012 only in those from animals. MRSA ST1-t127 isolates and some ST398-t011 and ST398-t1197 isolates presented a multiantimicrobial-resistance phenotype. None of them harbored *lukF/lukS*, *tst*, *eta* and *etb* virulence genes. This study showed that the efficacy of nasal MRSA decolonization in healthy people with very close contact with pigs is especially low.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is frequently found on the skin and in the nares of humans and animals, especially mammals, without causing illness. Nevertheless, it is also an opportunist pathogen and in some instances, it can produce minor and severe infectious diseases. Methicillin-resistant

S. aureus (MRSA) is known for its impact on public health. MRSA was traditionally considered a nosocomial pathogen, however, community-associated MRSA (CA-MRSA) has also emerged as an important public health concern worldwide.

In the last 5 years, a “livestock-associated” MRSA (LA-MRSA) of sequence type (ST) 398, is emerging in different countries. MRSA ST398 was described in The Netherlands [1] and the number of cases is increasing. It has already been detected in some European countries [2–4], Canada [5], USA [6] and Asia [7,8]. Pigs are considered the main

* Corresponding author. Tel.: +34 941299750; fax: +34 941299721.
E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).

reservoir for this MRSA lineage, and a high level of MRSA ST398 isolation has been reported in humans, not only in those with direct contact with these animals, such as pig farmers and veterinarians, but also in their relatives [2,4,5]. The transmission of MRSA ST398 from pig farmers and veterinarians to their pets has also been reported [9], addressing that colonized pets may serve as vectors of MRSA strains. All these data emphasize the possible role of farm animals, especially pigs, as a vehicle for human colonization and infection by MRSA ST398.

It is important to consider the problem that would entail the entrance of MRSA ST398 colonized humans in the health-care system, given that the general population might be exposed to this resistant microorganism. Nasal decolonization of *S. aureus* with mupirocin is a treatment especially used before surgery to reduce the risk of infection. Nevertheless, information on the efficacy of mupirocin decolonization of MRSA ST398 among people living close to the animal reservoir is scarce. In this regard, a Dutch study described an unsuccessful decolonization in some human clinical cases related to pig farms [1].

A skin infection caused by two MRSA lineages (ST398/*spa*-type t011; ST1/*spa*-type t127) was previously reported in the daughter of a pig farmer in Spain [10]. All four family members were nasal carriers of MRSA isolates of ST398 and/or ST1 genetic lineages [patient–daughter (ST398-t108), mother (ST398-t108 and ST1-t127), father (ST398-t108), and son (ST398-t011)]. This family lived very close to the pig farm where the father and the mother worked. This study's objectives were to analyze the dynamic of MRSA nasal colonization in the four family members after a decolonization treatment with mupirocin (1 dose/12 h/7 days), as well as to study the prevalence of MRSA in randomly selected pigs of that farm. Molecular typing and genetic characterization of those MRSA isolates obtained from humans and animals were performed to determine the possible animal to human MRSA transmission.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

The four members of a family (mother, father, daughter and son) previously colonized by MRSA ST398 and/or ST1, and who lived very close to the farm where the parents worked, were included in this study. A total of eight nasal samples were swabbed from each of the four family members on different occasions after mupirocin treatment: (1) immediately after this treatment; (2) 48 h; (3) 4 days; (4) 1 week; (5) 3 weeks; (6) 2 months; (7) 3 months; and (8) 8 months after the treatment. Nasal swabs were inoculated onto oxacillin resistance screening agar (ORSA, Oxoid), blood agar (Oxoid) and colistin nalidixic acid agar plates (CNA, BioMérieux) and incubated at 35 °C for 36 h.

In addition, nasal/ear swabs from 21 randomly selected pigs of the farm were taken. Animal samples were inoculated into brain heart infusion broth (BHI, Difco) containing 6.5% NaCl and incubated at 35 °C for 24 h. An aliquot of 100 µL were then seeded on oxacillin resistance screening agar base plates (ORSAB, Oxoid) with oxacillin (2 mg/L),

and incubated at 35 °C for 36 h. Presumptive MRSA colonies were selected and further identified by different biochemical methods: Gram staining, and catalase and DNase activities. Confirmation of MRSA was determinate by *nuc* (*S. aureus* thermonuclease gene) and *mecA* (methicillin resistant gene) PCR [11]. All MRSA isolates were stored at –80 °C.

2.2. Susceptibility testing and detection of antimicrobial resistance genes

Antimicrobial susceptibility testing was implemented by VITEK 2 system (BioMérieux) and the tested antibiotics were as follows: penicillin, oxacillin, cefoxitin, erythromycin, telithromycin, clindamycin, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, tobramycin, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, vancomycin, teicoplanin, mupirocin, linezolid, fosfomicin, nitrofurantoin, fusidic acid, and rifampin. Kanamycin susceptibility was tested by disk diffusion agar [12]. The presence of *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *aph(2'')-acc(6')*, *ant(4')*, *aph(3')*, and *dfrK* antimicrobial resistance genes was analyzed by PCR and in some cases by sequencing [10]. Mutations in quinolone targets were determined by sequence analysis of *grlA* and *gyrA* genes in ciprofloxacin-resistant isolates [13].

2.3. Molecular typing

All human and animal MRSA isolates were characterized by molecular typing. Determination of SCC_{mec} type was performed by multiplex PCR as previously reported [14]. Multilocus Sequence Typing (MLST) (saureus.mlst.net) and single-locus DNA sequencing of *S. aureus* protein A (*spa*) [15] was performed by PCR and sequencing and *agr* allotyping was carried out by two multiplex PCR [16]. Pulsed-field-gel-electrophoresis (PFGE) was implemented as previously described [17]. Due to the non-typeable of some isolates using SmaI restriction enzyme, all MRSA isolates were studied using ApaI restriction enzyme [18]. PFGE patterns were compared according to Tenover criteria [19].

2.4. Virulence factors

The presence of the genetic determinants of Pantone-Valentine-Leukocidin (*lukF/lukS*), Toxic-Shock-Syndrome-Toxin 1 (*tst*), and Exfoliative-Toxin A (*eta*), B (*etb*) and D (*etd*) was analyzed by PCR and sequencing [10,20,21].

3. Results

Nasal swabs of all family members obtained from the 1st to 4th sampling periods (up to 1 week after mupirocin decolonization) were negative for MRSA. Nevertheless, MRSA were detected from the 5th to 8th periods (between 3 weeks and 8 months after treatment) for the mother and the father. MRSA isolates detected in the mother were typed as ST398-t011, ST398-t1255, ST398-t1197 and ST1-t127, and those isolated from the father were typed as ST398-t108 and ST398-t1255. As for the daughter, samples from periods 5th and 7th were negative for MRSA, being

Table 1

Characteristics of the MRSA isolates recovered from the family members after the mupirocin treatment.

Origin of MRSA	Sampling period ^a	Typing of MRSA				Antimicrobial resistance phenotype for non-beta-lactams ^b	Resistance genes detected	Amino acid change in	
		SCCmec	agr	MLST/spa	PFGE pattern			GrlA	GyrA
Mother	5	II	III	ST1/t127	C	T, E, C, G, TB, K, CP, L, S	<i>tetK, tetL, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2'')-acc(6'), ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
Mother	5	V	I	ST398/t011	B	T, E, C, G, TB, K, S	<i>tetK, tetL, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2'')-acc(6'), ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	NP ^c	NP
Mother	5	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C	<i>tetK, tetL, tetM, ermC, msrA</i>	NP	NP
Mother	6	II	III	ST1/t127	C	T, E, C, G, TB, K, CP, L, S	<i>tetK, tetL, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2'')-acc(6'), ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
Mother	7	II	III	ST1/t127	C	T, E, C, G, TB, K, CP, L, S	<i>tetK, tetL, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2'')-acc(6'), ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
Mother	7	V	I	ST398/t1197	D	T, E, C, TB, K, CP ¹ , L ¹ , S	<i>tetK, tetL, tetM, ermA, ermC, ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	NP	NP
Mother	8	II	III	ST1/t127	C	T, E, C, G, TB, K, CP, L, S	<i>tetK, tetL, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2'')-acc(6'), ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
Mother	8	V	I	ST398/t1197	D	T, E, C, TB, K, CP ¹ , L ¹ , S	<i>tetK, tetL, tetM, ermA, ermC, ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	NP	NP
Father	5	V	I	ST398/t108	A1	T, E, C, CP ¹ , L ¹ , S	<i>tetK, tetL, tetM, ermA, ermC, dfrK</i>	Wild	Wild
Father	5	V	I	ST398/t108	A1	T, E, C	<i>tetK, tetL, tetM, ermA, ermC</i>	NP	NP
Father	6	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C	<i>tetK, tetL, tetM, ermA, ermB, ermC, msrA</i>	NP	NP
Father	7	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C	<i>tetK, tetL, tetM, ermA, ermC</i>	NP	NP
Father	7	V	I	ST398/t108	A1	T, E, C, CP ¹ , L ¹	<i>tetK, tetM, ermA, ermC</i>	NP	NP
Father	8	V	I	ST398/t108	A1	T, E, C, CP ¹ , L ¹	<i>tetK, tetM, ermA, ermC</i>	NP	NP
Daughter	6	II	III	ST1/t127	C	T, E, C, G, TB, K, CP, L, S	<i>tetK, tetL, ermA, ermB, ermC, msrA, aph(2'')-acc(6'), ant(4'), aph(3'), dfrK</i>	S80F	S84L
Daughter	8	V	I	ST398/t108	A1	T, E, C, CP ¹ , L ¹	<i>tetK, tetM, ermA, ermC</i>	NP	NP

^a Samples were obtained at 8 different moments after the mupirocin treatment: (5) 3 weeks; (6) two months; (7) three months; and (8) eight months after treatment. No MRSA were obtained in the moments 1–4 in any of tested individuals.

^b T, tetracycline; E, erythromycin; C, clindamycin; G, gentamicin; TB, tobramycin; K, kanamycin; CP, ciprofloxacin, L, levofloxacin; S, sulfamethoxazole-trimethoprim; ¹, intermediate. All strains were susceptible to the following nine antibiotics: quinupristin/dalfopristin, linezolid, vancomycin, teicoplanin, fosfomycin, nitrofurantoin, fusidic acid, rifampin and mupirocin.

^c NP, non-performed.

Table 2
Characteristics of MRSA isolates recovered from pigs of the farm.

Animal	Typing of MRSA		Antimicrobial resistance phenotype for non-β-lactams ^a		Resistance genes detected	Amino acid change in		
	SCCmec	agr	MLST/spa	PFGE pattern		GrIA	GyrA	
1	V	I	ST398/t011	B	T, E, C, G, TB, K, S	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>aph(2'')-acc(6')</i> , <i>ant(4')</i> , <i>aph(3')</i> , <i>dfpK</i>	NP ^b	NP
1	III	III	ST793/t012	E	T, E, C, G, TB, CP, L, S	<i>tetK</i> , <i>ermA</i> , <i>msrA</i> , <i>aph(2'')-acc(6')</i> , <i>ant(4')</i> , <i>dfpK</i>	Wild	Wild
2	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	NP	NP
3	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C, G, TB, S	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>ant(4')</i> , <i>dfpK</i>	NP	NP
4	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	NP	NP
5	V	I	ST398/t1255	A2	T, E, C	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	NP	NP
6	V	I	ST398/t1197	D	T, E, C, TB, K', CP', L', S	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermA</i> , <i>ermC</i> , <i>ant(4')</i> , <i>aph(3')</i> , <i>dfpK</i>	NP	NP
7	V	I	ST398/t1197	D	T, E, C, TB, K', CP', L', S	<i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>ermA</i> , <i>ermC</i> , <i>ant(4')</i> , <i>aph(3')</i> , <i>dfpK</i>	NP	NP

^a T, tetracycline; E, erythromycin; C, clindamycin; G, gentamicin; TB, tobramycin; K, kanamycin; CP, ciprofloxacin; L, levofloxacin; S, sulfamethoxazole-trimethoprim; '1, intermediate. All strains were susceptible to the following nine antibiotics: quinupristin/dalfopristin, linezolid, teicoplanin, vancomycin, fosfomicin, nitrofurantoin, fusidic acid, rifampin and mupirocin.

^b NP, non-performed.

positive those obtained on the 6th and 8th sampling periods (ST1-t127 and ST398-t108) (Table 1). No MRSA isolates were detected in any sample from the son.

All ST1-t127 isolates contained the *tetK*, *tetL*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *aph(2'')-acc(6')*, *ant(4')*, *aph-(3')* and *dfpK* resistance genes, and the Ser80Phe and Ser84Leu amino acid changes were detected in GrIA and GyrA proteins, respectively (Table 1). Some ST398-t011 and ST398-t1197 isolates also presented a multiantimicrobial-resistance phenotype (resistance to tetracycline, macrolides, aminoglycosides and sulfamethoxazole-trimethoprim), and harboured different antimicrobial resistance genes (Table 1).

Twenty-one pigs were analysed and 7 (33%) carried MRSA ST398. Two MRSA isolates from different clonal lineages were detected in one of the pigs (ST398 and ST793). The 8 MRSA isolates obtained from the seven positive pigs were ascribed to four different *spa*-types: t011, t1255 and t1197 (belonging to ST398 lineage), and t012 (corresponding to ST793, not included in clonal complex CC398). All MRSA animal isolates presented resistance to tetracycline, erythromycin and clindamycin, and five of them resistance to other antimicrobial agents such as gentamicin, tobramycin, kanamycin, and/or sulfamethoxazole-trimethoprim. Some MRSA ST398 isolates presented diminished susceptibility to ciprofloxacin and levofloxacin. Moreover, MRSA ST793 isolate was resistant to quinolones regardless no amino acid changes in GrIA and GyrA proteins were detected (Table 2).

All ST398 isolates obtained from humans and animals were typed as SCCmecV-agrI. All ST1 isolates from human origin were typed as SCCmecII-agrIII, and *spa*-t127, and the ST793 strain recovered from a pig was typed as SCCmecIII-agrIII, and *spa*-t012 (Tables 1 and 2).

In addition, all MRSA isolates studied (either those obtained from humans and animals) were analyzed by PFGE using *Apal* restriction enzyme. Five unrelated pulsotypes were identified (A–E), and two subtypes were revealed in pulsotype A (A1 and A2) (Tables 1 and 2, Fig. 1). Each *spa*-type was ascribed to a specific pulsotype (pulsotype/*spa*-type): A1/t108, A2/t1255, B/t011, C/t127, D/t1197, and E/t012.

None of MRSA isolates from humans and animals presented *lukF/lukS*, *tst*, *eta*, *etb* or *etd* virulence genes.

4. Discussion

Recolonization by MRSA ST398 and/or ST1 occurred in this study after 3 weeks of effective mupirocin treatment in the mother and in the father, and these resistant isolates were persistently detected in all nasal samples obtained after that period. The mother and the father worked on the farm and had intense contact with the live animals on the pig farm. In the case of the daughter and the son, whom both had sporadic contact with pigs, the recolonization process was different. The daughter was intermittent colonized by ST398 and/or ST1 after two months of the mupirocin treatment, and the son was not recolonized along the whole studied period (up to eight months of mupirocin treatment). It is clear that the quickness of MRSA recolonization in people in contact

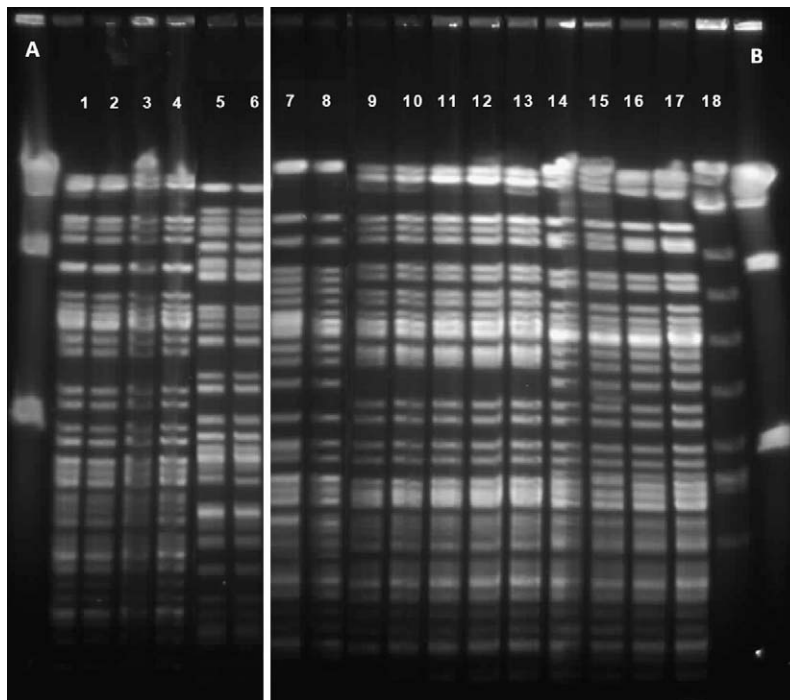


Fig. 1. PFGE patterns of chromosomal DNA digested with Apal enzyme of MRSA isolates recovered from humans and animals in this study. Gel A: lines 1–4: t1255 (pulsotype A2); lines 5–6: t127 (pulsotype C). Gel B: lines 7–8: t011 (pulsotype B); lines 9–13: t108 (pulsotype A1); lines 14–17: t1197 (pulsotype D); line 18: t012 (pulsotype E).

with farm animals depends on the contact level with these animals.

On the other hand, MRSA of clonal lineage ST398 were detected in nasal-ear samples of 33% of tested pigs. MRSA ST398 have been very frequently detected in pigs and in dust samples of pig farms in different European countries, including in Spain, indicating its wide dissemination in this ecosystem [22–24]. In addition, a recent study carried out in Spain found a high level of MRSA colonization among slaughter pigs [20].

Four different *spa*-types were identified among MRSA ST398 of humans and animals, and isolates corresponding to *spa*-types t011 and t1197 were resistant to more antibiotics than those with *spa*-types t1255 and t108 (Tables 1 and 2). The MRSA isolates of animal origin with *spa*-types t011 or t1255 showed the same phenotype and genotype of resistance as those detected in human nasal samples (with few exceptions), suggesting the animal to human transmission of these isolates.

All MRSA isolates of the genetic lineage ST1-t127 showed a multiantimicrobial-resistance phenotype. MRSA ST1-t127 isolates have not been detected in this study among the animals tested, although this MRSA lineage was previously identified in a skin lesion of the daughter of the studied family [10], and has also been detected in the present study in the nasal samples of the mother and the daughter. The number of pigs tested in this study was low, therefore the possible presence of MRSA ST1 in a few percentage of animals (no detected with the implemented methodology, despite enrichment step was performed) cannot be discarded. Although, this clonal type

seems to be related with human-associated CA-MRSA isolates circulating in Europe [25], ST1-t127 isolates have been detected in pig farms in Spain and in other countries [22,23], suggesting the possible animal origin of this MRSA genetic lineage. In addition, ST1 has been detected in other animal species as cows [26] and horses [27], and the possible animal to worker transmission was suggested in both cases. These studies suggest the ability of this clonal lineage to adapt to different species of animals and also to humans.

The ST793-t012 MRSA strain detected in one pig in this study also presented a multiantimicrobial-resistance phenotype, harbouring six resistance genes. *Spa*-type t012 is so far uncommonly found in animals, nevertheless, it seems to be frequent among human clinical *S. aureus* isolates. This *spa*-type has been associated with ST30 [28], which belong to the CC30. Alternatively, ST793 belongs to the CC188, which is related with CA-MSSA and CA-MRSA [29,30]. However, there are no studies that associate this *spa*-type (t012) with ST793.

It is important to remark the presence of the *aph(2'')-acc(6')* aminoglycoside resistance gene among the ST1-t127, ST398-t011 and ST793-t012 MRSA isolates obtained from humans and animals. In addition, most MRSA isolates obtained in this study presented two or more genes for tetracycline and macrolides resistance.

Interestingly, each *spa*-type was ascribed to a specific pulsotype and some *spa*-types with indistinguishable PFGE patterns were detected among isolates of both human and animal origins, as it is the case of A2/t1255, B/t011 and D/t1197, suggesting animal to human MRSA transmission.

All MRSA isolates were negative for all tested toxin genes. The presence of PVL is uncommon among MRSA ST398 and ST1, although PVL-positive isolates belonging to these STs have been described on several occasions [25,29,31–33]. On the other hand, MRSA PVL positive isolates that belong to CC188 have been also reported [29,34].

The efficacy of nasal MRSA decolonization in healthy persons with very close contact with pigs (as is the case of pig farmers) is low, and recolonization by MRSA ST398 and/or ST1 occurs after several weeks of effective mupirocin treatment. The efficacy seems to be higher in people with sporadic contact with animals or contact with MRSA colonized humans. In any case, prophylactic intranasal mupirocin could be useful when these MRSA-carriers enter in the health-care system, in order to reduce the potential spread of this resistant microorganism [35,36]. MRSA isolates involved in recolonization in this study belong to different *spa*-types associated to ST398. The potential transmission of ST398 from animals to humans is suggested in this study, as similar *spa*-types with indistinguishable PFGE patterns have been detected in animals and in humans living in close contact with these animals.

This work was partially presented in ASM-ESCMID, Conference on methicillin-resistant staphylococci in Animals. London, September 2009.

Conflict of interest statement

No conflict of interests do exist in this manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Project SAF2009-08570 from the Ministry of Education and Science of Spain and FEDER. C. Lozano has a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and E. Gómez-Sanz a fellowship from the Gobierno de La Rioja of Spain.

References

- [1] Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1965–6.
- [2] Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørum M, et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1383–9.
- [3] Meemken D, Cuny C, Witte W, Eichler U, Staudt R, Blaha T. Zum Vorkommen von MRSA bei Schweinen und bei Menschen mit beruflicher Exposition zum Schwein: Erste Ergebnisse einer Studie in Nordwestdeutschland [Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production-preliminary results of a study in the northwest of Germany]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2008;115:132–9. In German.
- [4] Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2007;13:255–8.
- [5] Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 2008;128:298–303.
- [6] Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One* 2008;4:e4258.
- [7] 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;64:680–703.
- [8] Sergio DM, Koh TH, Hsu LY, Ogden BE, Goh AL, Chow PK. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol* 2007;56:1107–9.
- [9] Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Schwarz S, et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:660–2.
- [10] Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, Torres C. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis* 2010;16:157–9.
- [11] 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;64:1325–6.
- [12] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement. M100-S19. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2009.
- [13] Schmitz FJ, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Lückefahr M, Klootwijk M, et al. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *griA*, *griB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:481–4.
- [14] 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;43:5026–33.
- [15] Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald, 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.
- [16] Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, et al. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol* 2003;41:456–9.
- [17] Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, struelens M, Zinn CE, 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.
- [18] Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, et al. Diversity of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:1156–64.
- [19] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [20] Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea, et al. 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*; in press.
- [21] Lina G, Piémont F, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999;29:1128–32.
- [22] 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* 2009;7:1376.
- [23] Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Lurescia M, Lorenzetti R, et al. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet Microbiol* 2010;142:361–6.
- [24] Tenhagen BA, Fetsch A, Stührenberg B, Schleuter G, Guerra B, Hammerl JA, et al. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *Vet Rec* 2009;14:589–93.
- [25] Otter JA, French GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:670–6.
- [26] Juhász-Kaszanyitzky E, János S, Somogyi P, Dàn A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis* 2007;13:630–2.
- [27] 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;14:307–10.

- [28] Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 2010;7:e1000215.
- [29] Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA, et al. Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. *J Clin Microbiol* 2010;48:867–72.
- [30] O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Gracey M, Moss F, Christiansen KJ, et al. Population dynamics of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:684–93.
- [31] Deurenberg RH, Nulens E, Valvatne H, Sebastian S, Driessen C, Craeghs J, et al. Cross-border dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Euregio Meuse-Rhin region. *Emerg Infect Dis* 2009;15:727–34.
- [32] Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L, Oberg S, Karlsson L, Ahrén C. Infection with Pantón-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1271–2.
- [33] Yu F, Chen Z, Liu C, Zhang X, Lin X, Chi S, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Pantón-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalized patients in China. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:381–4.
- [34] Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch, et al. Global Distribution and Evolution of Pantón-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *J Infect Dis* 2010;201:1589–97.
- [35] Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, et al. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2010;362:9–17.
- [36] van Rijen MM, Bonten M, Wenzel RP, Kluytmans JA. Intranasal mupirocin for reduction of *Staphylococcus aureus* infections in surgical patients with nasal carriage: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:254–61.

Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain

Carmen Lozano, María López, Elena Gómez-Sanz, Fernanda Ruiz-Larrea, Carmen Torres and Myriam Zarazaga*

Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

Keywords: MRSA, food microbiology, ST398, ST125, ST217

*Corresponding author. Tel: +34-941-299751;
Fax: +34-941-299721; E-mail: myriam.zarazaga@unirioja.es

Sir,
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains belonging to clonal lineage sequence type (ST) 398 are being reported at an increasing frequency in Europe.¹ This new MRSA type has been isolated from colonized and infected animals and humans, and also from meat in some countries,^{1,2} representing a risk to human health; nevertheless, so far, no data about detection of MRSA ST398 in food in Spain have been published.

A total of 318 raw food samples of food-producing animals (148 chicken, 55 pork, 46 veal, 19 lamb, 10 turkey, 8 rabbit and 12 minced-meat samples) and of wild animals (8 game bird, 4 wild boar, 4 deer and 4 hare samples) were collected from November 2007 to March 2009 in La Rioja (Spain). Samples were suspended in saline solution and 100 µL was inoculated in brain heart infusion (BHI) broth containing 6.5% NaCl, and incubated at 35°C for 24 h. Then, 300 µL was seeded on ORSAB plates (Oxoid) with oxacillin (2 mg/L), and incubated at 35°C for 36 h. One blue presumptive MRSA colony per sample was selected and identified by DNase assay and by PCRs of the *mecA* and *nuc* genes.^{3,4}

MICs of 10 antibiotics were determined by the agar dilution method; the disc diffusion method was used for 7 additional antibiotics (Table 1). The presence of resistance genes was studied by PCR.⁴ Mutations in quinolone targets were determined by sequence analysis of *grrA* and *gyrA* genes.⁵ Recovered MRSA isolates were characterized by multilocus sequence typing (MLST) (saureus.mlst.net), staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing,³ *spa* typing (www.ridom.com) and *agr* typing.⁶ The presence of Pantón–Valentine leucocidin (PVL) genes was investigated by PCR.⁶

MRSA was detected in 5 of the 318 (1.6%) food samples (from pork, chicken, rabbit, veal and wild boar). MRSA strains were characterized and the results are summarized in Table 1. The two strains from pork and veal corresponded to ST398-SCC*mecV* (*spa* types t011 and t1197, respectively), the two strains from chicken and rabbit were typed as ST125-SCC*mecIVa*-t067, and the strain from a wild boar was ST217-SCC*mecIVa*-t032. All MRSA were PVL negative.

MRSA has also been isolated from meat in other countries, and the percentages detected varied widely (0%–11%). The rate found in our study (1.6%) is in the lower range of the reported data, and higher percentages have recently been reported in the Netherlands and the USA.^{2,3} A correlation between meat type and rate of MRSA contamination cannot be established as the numbers of samples of different origins in our study differ significantly. The detection of the MRSA ST217 strain in one of the four tested wild boar samples is noteworthy. A previous study had also reported non-ST398 MRSA in food derived from game in a low percentage of samples (2.2%).²

Although MRSA prevalence in raw food is low, the risk of its transmission through the food chain cannot be disregarded, especially in uncooked meat. Indeed, foodborne disease outbreaks caused by MRSA have been reported.⁷ Moreover, contaminated foods may also constitute a health risk for food handlers. Carcasses obtained from animals colonized by MRSA may become contaminated during slaughter and foods can also become contaminated during processing by food handlers colonized by MRSA. Molecular typing is a useful tool for understanding the origin of these strains. In our study two MRSA strains were ST398, suggesting that animals could be the source of contamination. Both ST398 strains presented resistance to tetracycline, a characteristic of animal-related MRSA. Tetracycline is the most widely used antibiotic in the pig industry; macrolides and aminoglycosides are also used, but less frequently. The origin of ST398 is unclear, but the excessive use of certain antibiotics in animal production might be implicated in its emergence. A reservoir of MRSA ST398 seems to be present in food-producing animals and a high rate of nasal carriers has been found in humans in contact with these animals, which may have consequences for human health.¹ ST398 has been detected in several European countries, America and Asia. Due to the significant spread of this variant, it was expected to also be present in Spain, but, to our knowledge, this is the first report of ST398 in foods in a Mediterranean country.

The other non-ST398 strains in our study were ST125-t067 and ST217-t032, types associated with human infections, suggesting a possible human origin, and might have been transmitted by colonized food handlers. According to a recent publication, MRSA ST125-t067 was implicated in >50% of the invasive infections in Spanish hospitals.⁶ Moreover, those authors described that simultaneous resistance to ciprofloxacin, tobramycin and erythromycin is frequently found in isolates belonging to *spa*-t067, a variant carrying *ant(4′)-Ia* and *msrA* genes.⁶ One of our ST125-t067 strains presented all these characteristics. On the other hand, ST217 is a variant of epidemic EMRSA-15⁵ and was reported to present the characteristics of nosocomial MRSA with a high level of ciprofloxacin resistance, which is in accordance with our results.

In conclusion, MRSA was detected in 1.6% of meat samples in our study. Strain characterization suggests that they could be from both animal and human origin. Although the presence of MRSA in food is low, it has to be monitored because it can contribute to the spread of MRSA. To our knowledge, this is the first study concerning the prevalence of MRSA in food in Spain.

Table 1. Characteristics of the five MRSA strains^a isolated from food samples in this study

Origin	MLST/spa	SCC _{mec}	agr	MIC (mg/L)										Amino acid change		Resistance genes detected	
				OXA	FOX	TET	TOB	KAN	STR	ERY	ERY	CLI	CIP	LEV	GrlA		GyrA
Pork	ST398/t011	V	I	8	16	128	0.25	2	256	>256	>128	0.125	0.125	NP	NP	NP	mecA, tet(K), tet(M), erm(A), erm(C)
Veal	ST398/t1197	V	I	64	32	128	32	32	8	>256	>128	0.5	S80F	S84L	S84L	mecA, tet(K), tet(L), tet(M), anti(4')-Ia, aph(3'), erm(C), msr(A)	
Chicken	ST125/t067	IVa	II	128	128	0.25	>256	128	8	0.25	0.06	4	S80F	S84L	S84L	mecA, anti(4')-Ia, aph(3')	
Rabbit	ST125/t067	IVa	II	128	128	0.25	>256	128	8	>256	>128	4	S80F	S84L	S84L	mecA, anti(4')-Ia, aph(3'), erm(A), erm(C), msr(A)	
Wild boar	ST217/t032	IVa	I	32	32	0.125	0.25	2	8	0.25	0.06	4	S80F	S84L	S84L	mecA	

OXA, oxacillin; FOX, cefoxitin; TET, tetracycline; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; NP, not performed.

^aThe five strains were susceptible to the following seven antibiotics by the disc diffusion method: gentamicin; chloramphenicol; trimethoprim/sulfamethoxazole; vancomycin; teicoplanin; mupirocin; and fusidic acid.

Unveiling the role of MRSA ST398 as a zoonotic foodborne pathogen requires more research.

Funding

This study was financially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. C. L. has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, and M. L. and E. G.-S. have a fellowship from the Gobierno de la Rioja of Spain.

Transparency declarations

None to declare.

References

1. 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.
2. de Boer E, Zwartkuis-Nahuis JTM, Wit B *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* 2009; **134**: 52–6.
3. Pu S, Han F, Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 265–7.
4. Domínguez E, Zarazaga M, Torres C. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2638–41.
5. Qi W, Ender M, O'Brien F *et al.* Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCC_{mec} and a new SCC_{mec} element associated with isolates from intravenous drug users. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5164–70.
6. Pérez-Vazquez M, Vindel A, Marcos C *et al.* 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**: 21–31.
7. Jones TF, Kellum ME, Porter SS *et al.* An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 82–4.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

doi:10.1093/jac/dkp374

Advance Access publication 16 October 2009

Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer

Noriyuki Nagano^{1,2}, Kouji Kimura¹, Yukiko Nagano¹, Hiroaki Yakumaru³ and Yoshichika Arakawa^{1*}

¹Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Musashi-murayama, Tokyo 208-0011, Japan; ²Medical Microbiology Laboratory, Funabashi Municipal Medical Center, 1-21-1 Kanasugi, Funabashi, Chiba 273-8588, Japan; ³Department of Plastic Surgery, Funabashi Municipal



Staphylococcus aureus nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains

Carmen Lozano^a, Elena Gómez-Sanz^a, Daniel Benito^a, Carmen Aspiroz^b, Myriam Zarazaga^a, Carmen Torres^{a,*}

^a Area Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logrono, Spain

^b Laboratorio Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2010

Received in revised form

22 December 2010

Accepted 22 February 2011

Keywords:

S. aureus
Nasal carriage
MRSA
CC398
CC97
TSST-1

ABSTRACT

S. aureus nasal carriage was investigated in 278 healthy humans, determining the antibiotic resistance mechanisms, virulence traits, and genetic lineages of recovered isolates. Nasal samples were cultured in specific media for *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) recovery. *S. aureus* was detected in 53 of 278 nasal samples (19.1%); MRSA was found in one sample (0.4%) and methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) in the remaining 52 samples. The MRSA isolate was typed as ST1649-t701-*agr*I-SCC*mec*-IVc and only exhibited resistance to beta-lactams. A high diversity of *spa* types ($n = 37$) was identified among the 52 MSSA, identifying 5 new *spa*-types. Multi-locus sequence typing (MLST) typing was performed in 30 selected MSSA, detecting 16 different sequence types, 2 of them being new. MSSA strains presented *agr* types I (30.2%), II (30.2%), III (34%), and IV (5.6%). Eleven strains showed erythromycin resistance and harbored different combinations of *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(T), and *msr*(A) genes. Two strains exhibited ciprofloxacin resistance, and one of them presented amino acid changes in GyrA and GrlA proteins. The presence of 28 genes encoding staphylococcal toxins was investigated by PCR in all 53 *S. aureus* isolates. The toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) gene was detected in 15 MSSA isolates (11 of them typed within the clonal complex CC30) and the gene of exfoliative toxin A in 2 strains. Different combinations of enterotoxin genes were identified among *S. aureus* strains. None of the *S. aureus* isolates harbored the Pantone-Valentine leukocidin gene. Two MSSA presented the sequence-type ST398 [harboring *erm*(T) gene], and 2 additional isolates were typed as ST97. Interestingly, MSSA CC398 and CC97 isolates were detected. These clonal complexes are associated with food-producing animals.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen commonly found as part of the normal microbiota of the nose, skin, mouth, and other parts of the body, without causing diseases. *S. aureus* nasal carriage (SANC) can be detected in up to 50% of healthy humans, either in a persistent or in an intermittent way (Frank et al., 2010). There is current information about host factors predisposing for SANC; however, there are few data on the genetic characteristics of these strains or whether their genotype can be associated with specific hosts (Sakwinska et al., 2009).

SANC has been identified as a risk factor for the development of human infections. *S. aureus* is generally associated with skin and soft tissue infections, although it is also able to cause serious dis-

eases such as pneumonia, meningitis, or septicemia (Lina et al., 1999). An additional characteristic is that these strains can produce numerous adhesins and virulence factors which facilitate cellular invasion, bacterial growth and reduction of immune system cells. Some of these toxins are Pantone-Valentine leukocidin (PVL), toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), and different hemolysins, exfoliatins, and staphylococcal enterotoxins (Jarraud et al., 2002). The severity of *S. aureus* infections can be associated with the production of some of these toxins, as it is the case of PVL (associated with staphylococcal skin and pulmonary infections), TSST-1 (related to the toxic shock syndrome), and SEs (involved in food poisoning).

It is also important to consider the capacity of *S. aureus* to acquire antibiotic resistance genes. The increase of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) in hospital settings (HA-MRSA) and in the community (CA-MRSA) is worrisome. Besides being resistant to all beta-lactams, these strains are frequently resistant to other antibiotics and in some cases (especially CA-MRSA), they are able to produce important virulence factors as PVL. Nonetheless, in spite

* Corresponding author. Spain. Tel.: +34 941299750; fax: +34 941299721.
E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).

of the spread of MRSA, nowadays, colonizing *S. aureus* strains are mostly susceptible to methicillin (MSSA) (Kluytmans et al., 1997; van Belkum et al., 2009). Although some studies among healthy people show an increase in the prevalence of *S. aureus* and the detection of MRSA (Bloomfield et al., 2007), for the moment, the frequency of MRSA nasal healthy carriers (in people without risk factors) remains very low (Sakwinska et al., 2009; Mertz et al., 2009; Shopsin et al., 2000; Ben Slama et al., 2011). Moreover, new animal-related clonal lineages of *S. aureus* are emerging, as it is the case of the sequence type (ST) ST398 (Armand-Lefevre et al., 2005) and to a lesser extent ST97 (EFSA, 2009b). It is interesting to study the possible presence of isolates of these clonal lineages in people without risk factors.

The aim of this study was to investigate the SANC in healthy humans in Spain as well as to study the diversity of genetic lineages of these strains and the antibiotic resistance mechanisms and virulence traits for a better understanding of the genetic characteristics of *S. aureus* strains circulating among healthy people in our country.

Materials and methods

Bacterial isolates

Nasal swabs of 278 healthy volunteers with apparently no specific risk factors (contact with farm animals or contact with the health system) were randomly obtained from April to December 2009 in La Rioja (Spain). Individuals tested were: age range: 1–74 years, 113 males and 165 females. Samples were inoculated into Brain-Heart-Infusion (BHI) broth with 6.5% NaCl and incubated at 35 °C for 24 h. Then, 300 µL of this culture was seeded on Mannitol-Salt-Agar MSA (BD) for the recovery of *S. aureus* and on Oxacillin-Resistance-Screening-Agar-Base ORSAB (OXOID) with 2 mg/L of oxacillin for the isolation of MRSA, and plates were incubated at 35 °C for 36 h. Presumptive *S. aureus* and MRSA colonies were obtained in MSA (yellow colonies) and ORSAB plates (blue colonies), respectively. Identification of *S. aureus* (one colony per plate) was performed by conventional methods (DNase assay, catalase and Gram-staining) and by specific duplex PCR of the *nuc* (*S. aureus* thermonuclease gene) and *mecA* (staphylococci methicillin-resistance gene) genes (Lozano et al., 2011). *S. aureus* isolates were stored at –80 °C.

Molecular typing of isolates

All *S. aureus* were characterized by different molecular methods. Single-locus DNA sequencing of *S. aureus* protein A (*spa*) (Harmsen et al., 2003) was performed, and sequences obtained were analyzed using Ridom Staph-Type software version 1.5.21 (Ridom GmbH). Detection of *agr* allotypes was carried out by 2 multiplex PCRs as previously reported (Shopsin et al., 2003). SCCmec-typing was performed by multiplex PCR strategy in MRSA (Zhang et al., 2005). Multi-locus sequence typing (MLST) was implemented in 30 selected *S. aureus* strains. Sequences obtained by PCR and partial sequencing of 7 *S. aureus* housekeeping genes were studied according to MLST database (www.saureus.mlst.net).

Susceptibility testing and detection of antimicrobial resistance genes

Susceptibility testing was carried out by disk-diffusion agar method following the CLSI guidelines (CLSI, 2009). Antibiotics tested were as follows (in µg/disk): penicillin (10), oxacillin (1), cefoxitin (30), erythromycin (15), clindamycin (2), gentamicin (10), streptomycin (10), kanamycin (30), tobramycin (10), tetracycline (30), ciprofloxacin (5), chloramphenicol (30), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 + 23.75), vancomycin (30),

teicoplanin (30), mupirocin (5 and 200), and fusidic acid (10). In addition, D test was performed for the detection of inducible clindamycin resistance. Susceptibility to vancomycin and teicoplanin were also studied by agar dilution method (CLSI, 2009).

The presence of *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(T), and *msr*(A) resistance genes was studied by PCR (Lozano et al., 2011). Mutations in quinolone targets were determined by sequence analysis of *grlA* and *gyrA* genes (Lozano et al., 2009). Sequences were compared with those previously reported (GenBank accession number D67075 and M86227, respectively).

Virulence factors

The presence of genes encoding PVL, TSST-1, exfoliative toxin A (ETA), B (ETB), D (ETD), alpha-, beta-, delta-, gamma-hemolysin, gamma-hemolysin variant, and the 18 genes that encode staphylococcal enterotoxins (SEs) (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, and *seu*) was investigated by PCR and PCR multiplex (Jarraud et al., 2002; Lozano et al., 2011; Lina et al., 1999; Hwang et al., 2007).

Results

MRSA nasal carriage in healthy humans and molecular typing of MRSA

To screen for the presence of MRSA, samples were inoculated in ORSAB medium. MRSA was detected in one of the 278 samples analyzed (0.4%). This MRSA C2674 strain carried the *mecA* gene (detected by PCR), and it was typed as *spa* type t701, sequence type ST1649, *agr* type I and SCCmec-IVc. MRSA C2674 was susceptible to other non-beta-lactam antibiotics tested. A new nasal sample was obtained 9 months later from the person who carried strain C2674, and an MRSA isolate was again obtained. This new isolate presented the same phenotypic and genotypic characteristics as C2674, indicating that this person was probably a persistent MRSA carrier. In addition, her husband and her son were included in this study and no MSSA or MRSA were detected in their nasal samples.

SANC in healthy humans

To analyze SANC, the growth of samples in MSA agar plates was evaluated. *S. aureus* isolates were detected in 53 of the 278 tested nasal samples (19%), and one isolate per sample was further characterized. Fifty-two *S. aureus* isolates were methicillin-susceptible (MSSA), and the remaining one was MRSA (obtained from the sample in which an MRSA strain was also recovered from ORSAB medium, presenting the same phenotypic and genotypic profile). The characteristics of the 53 *S. aureus* isolates recovered in this study are shown in Table 1.

Phenotype and genotype of antibiotic resistance, and virulence genes in *S. aureus* isolates

All *S. aureus* but 4 isolates showed penicillin resistance (92.5%), and erythromycin and inducible clindamycin resistances were demonstrated in 11 MSSA isolates (20.8%). Among these isolates, diverse combinations of *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(T), or/and *msr*(A) genes were detected (Table 1). Two isolates showed ciprofloxacin resistance: One of them presented the Ser80Phe and Ser84Leu amino acid changes in GrlA and GyrA proteins, respectively; the other one had the Pro144Ser amino acid change in GrlA (outside quinolone resistance determining region QRDR) and no mutations in GyrA protein. The remaining MSSA isolates were susceptible to the remaining tested antibiotics.

Table 1
Characteristics of 53 *S. aureus* strains recovered from nasal samples of healthy people.

STRAIN	<i>Spa</i>	<i>agr</i>	MLST	CC ^a	Antimicrobial resistance phenotype ^b	Resistance genes	Cytotoxins	Pyrogenic toxin superantigen genes
C2674	t701	I	ST1649	CC6	PEN-OXA-FOX	<i>mecA</i>	<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>seb, sek</i>
C2547	t1641	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst-1, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2560	t018	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst-1, [seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2565	t342	II	ST30	CC30	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>erm(A)</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst-1, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2610	t6287 ^c	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst-1, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2632	t2071	III	ST30	CC30	PEN		<i>hld, hlg</i>	<i>tst-1, seh, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2633	t012	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst-1, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2680	t012	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst-1, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2682	t021	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst-1, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2687	t2147	III	ST30	CC30	PEN		<i>hla, hlb, hld</i>	<i>tst-1, sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2556	t6092 ^c	III	ST34	CC30	PEN-CIP ^e		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst-1, seh, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2552	t021	I	ST1731 ^d	CC30	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>msr(A), erm(A)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>tst-1, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2676	t1318	III	ST1732 ^d	Singleton	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>tst-1</i>
C2557	t375	III	ST509	CC509	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>erm(A)</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>tst-1, sek, seq</i>
C2558	t190	I	ST1498	CC8	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>erm(A), erm(C)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>tst-1</i>
C2611	t216	I	ST59	CC59	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>msr(A), erm(C)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>tst-1</i>
C2548	t209	II	ST1141	CC109	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>mrs(A), erm(A)</i>	<i>eta, hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2562	t270	IV	ST121	CC121	PEN		<i>eta, hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2549	t571	I	ST398	CC398	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>msr(A), erm(T)</i>	<i>hla, hld, hlg</i>	
C2679	t1451	I	ST398	CC398	ERY-CLI ⁱ	<i>erm(T)</i>	<i>hld, hlg</i>	
C2630	t6647 ^c	I	ST97	CC97	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2631	t6647 ^c	I	ST97	CC97	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2561	t6289 ^c	II	ST12	CC12	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2684	t6288 ^c	IV	ST121	CC121	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2691	t159	IV	ST121	CC121	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2677	t127	III	ST1	CC1	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[sea, sek, seq], seh</i>
C2551	t002	II	ST5	CC5	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2554	t002	II	ST5	CC5	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2559	t002	II		(CC5)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2643	t002	II		(CC5)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[sed, sej, ser], [seg, sei, sem, sen, seo, seu] seq</i>
C2683	t002	II		(CC5)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>[sed, sej, ser], [seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2673	t084	II	ST15	CC15	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>erm(A)</i>	<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2563	t084	II		(CC15)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2564	t084	II		(CC15)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2692	t228	II	ST15	CC15	PEN		<i>hla, hld</i>	
C2690	t228	II		(CC15)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2553	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2641	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2685	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2686	t012	III		(CC30)	PEN		<i>hlg</i>	
C2612	t190	I		(CC8)	PEN-ERY-CLI ⁱ	<i>msr(A), erm(B)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2555	t1008	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2609	t008	I		(CC8)	PEN		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	
C2628	t331	I		(CC45)	PEN		<i>hld, hlg</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2629	t331	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hlg</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo]</i>
C2642	t091	I		(CC7)	PEN		<i>hla, hld</i>	<i>sep</i>
C2644	t706	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>[sei, seg, sem, sen, seo, seu]</i>
C2675	t5955	I		(CC45)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo]</i>
C2550	t985	II		(CC5)	PEN-CIP ^f		<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>
C2688	t548	II		(CC5)	ERY-CLI ⁱ	<i>erm(C)</i>	<i>hla, hlb, hld, hlg-2</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu], sep</i>
C2627	t2949	II		(CC7/CC15)	PEN		<i>hla, hld, hlg-2</i>	
C2681	t122	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>
C2689	t233	III		(CC30)	PEN		<i>hla, hld, hlg</i>	<i>sea, [seg, sei, sem, sen, seu]</i>

^a Determined or presumptive (according to the *spa* type; in parentheses in this case).

^b PEN, penicillin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CIP, ciprofloxacin; i, inducible.

^c New *spa*-type.

^d New sequence-type.

^e P144S amino acid change was detected in GrIA (but outside QRDR), and no mutations were detected in GyrA protein.

^f S80F and S84L amino acid changes in GrIA and GyrA proteins were detected, respectively.

A high diversity of virulence factors was identified among the 53 *S. aureus* isolates, and none of them harbored PVL toxin genes (Table 2). Interestingly, 15 isolates harbored the TSST-1 toxin gene (*tst*, 28.3%) and 2 strains ETA toxin gene (*eta*, 3.8%). Most MSSA isolates carried the *hla* and *hld* genes. Other genes encoding hemolysins (*hla*, *hlg*, and *hlg-2*) were detected in about 50% of the isolates. Thirty-seven of 53 *S. aureus* isolates were positive for at least one SE gene. The SE genes more frequently found among *S. aureus* were *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, and *seu* located in the *ecg* operon (enterotoxin gene cluster) (Jarraud et al., 2001). Thirty-two of 53 *S. aureus* isolates presented the complete *ecg* operon or the *ecg*

operon lacking *seo* or *seu* genes. All *S. aureus* isolates were negative for *see* enterotoxin gene as well as for *etb* and *etd* exfoliative genes (Tables 1 and 2).

Molecular typing of *S. aureus* isolates

A high diversity of *spa* types ($n = 37$) were detected among the 53 *S. aureus* of this study, 5 of them being new and not previously reported (Table 1). These new *spa* types were registered in Ridom database with the accession numbers t6092, t6287, t6288, t6289, and t6647. The corresponding isolates were typed by MLST,

Table 2
Genes encoding exfoliative, PVL and TSST-1 toxins, and combination of enterotoxin genes detected in the 53 *S. aureus* strains.

Toxin gene	Positive strains		Predicted CC ^a (n) ^b
	%	Number	
<i>lukF/lukS</i>	0		
<i>tst-1</i>	28.3	15	CC8 (1), CC30 (11), CC509 (1), CC59 (1), singleton-ST1732 (1), CC9 (1), CC121 (1)
<i>eta</i>	3.8	2	
<i>etb</i>	0		
<i>etd</i>	0		
<i>sea</i>	13.2	7	CC30 (7)
<i>sea, sek, seq</i>	1.9	1	CC1 (1)
<i>seb</i>	1.9	1	CC6 (1)
<i>seb, sek, seq</i>	0		
<i>sec</i>	0		
<i>sec, sel</i>	3.8	2	CC97 (1), CC45 (1)
<i>sed, sej, ser</i>	3.8	2	CC5 (2)
<i>see</i>	0		
<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	3.8	2	CC45 (2)
<i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	22.6	12	CC5 (7), CC30 (1), CC45 (2)
<i>seg, sei, sem, sen, seu</i>	34	18	CC30 (14), CC121 (3)
<i>seh</i>	5.7	3	CC1 (1), CC30 (2)
<i>sek</i>	3.8	2	CC6 (1), CC509 (1)
<i>sel</i>	0		
<i>sem</i>	0		
<i>sep</i>	11.3	6	CC5 (4), CC7 (1), CC97 (1)
<i>seq</i>	3.8	2	CC5 (1), CC509 (1)

^a Determined on presumptive according to the *spa*-type.

^b The number of strains (n) are listed in parentheses.

and they were ascribed to the sequence types ST34, ST30, ST121, ST12, and ST97, respectively (Table 1). The most frequent *spa* types detected among *S. aureus* isolates of healthy humans in this study were t012 and t002, identified in 6 and 5 isolates, respectively. *S. aureus* isolates presented the *agr* types I (30.2%), II (30.2%), III (34%), and IV (5.6%).

Typing by MLST was carried out in 30 selected *S. aureus* isolates (*S. aureus* with unusual *spa* types, methicillin resistance, or important virulence factors). All 15 MSSA isolates carrying the gene of TSST-1 toxin were selected for MLST typing. Eleven *tst*-positive strains were ascribed to the clonal complex CC30. Nine of these 11 strains presented the sequence type ST30 (one of them with a new *spa* type t6287), one strain ST34 (differing only at *arc* locus in comparison with ST30 and also with a new *spa* type t6092), and another strain was ascribed to a new sequence type named ST1731, which is a single locus variant (SLV) of ST30. This new ST presents a single nucleotide mutation (A4G) at *pta* locus (allele 186), leading the Thr2Ala amino acid change. The remaining 4 *tst*-positive strains were ascribed to sequence types ST509, ST1498, ST59, and another new ST named ST1732 (singleton). This latter ST presents a new *pta* allele (187) that differs from the ancestral allele (44) in several mutations, resulting in the Ala19Thr and Asp44Glu amino acid changes.

On the other hand, the 2 *eta*-positive strains were typed as ST121 and ST1141, which corresponded to the clonal complexes CC121 and CC109, respectively.

MLST was carried out in the remaining strains in which a new *spa* type was identified. The STs obtained and the *spa* types found were as follows: ST12/t6289 (one strain) and ST97/t6647 (2 strains). Two MSSA strains with *spa* types t571 and t1451 were typed by MLST, and the sequence type ST398 was identified in both of them. These 2 strains showed erythromycin resistance and inducible clindamycin resistance and contained the *erm*(T) resistance gene;

however, these strains showed oxacillin and tetracycline susceptibility. Other sequence types identified in 6 additional isolates were (ST/associated *spa* type): ST1/t127, ST5/t002, ST15/t084, ST5/t228, and ST121/t159 (Table 1).

The clonal complexes of the 23 strains in which the MLST typing was not performed, was presumptively assigned according to the *spa* type detected (Table 1). Considering all data together, the most frequently clonal complex detected in this study was CC30 followed by CC5, CC15, and CC45.

Discussion

A moderate frequency of SANC (19.1%) has been detected in healthy people in this study. The incidence of this microorganism is different according to the population analyzed. In this study, the population studied did not belong to any risk groups. In other studies among the general population, the SANC rate reaches the 30% (Kluytmans et al., 1997; van Belkum et al., 2009), although this percentage may vary due to the sampling procedure and methodology applied.

The rate of MRSA carriage was low in our study (0.4%), as only one healthy individual was MRSA nasal carrier among the 278 tested. The percentages detected in other studies performed among people without risk factors in the USA and in Europe (Sakwinska et al., 2009; Shopsin et al., 2000) varied between 0.2 and 2%, usually less than 1%. The MRSA strain recovered from the positive individual in our study was typed as ST1649/t701 and belonged to CC6. *S. aureus* strains of this clonal complex have already been detected in nasal samples of asymptomatic carriers in other countries (Monecke et al., 2009), and MRSA CC6 with *spa* type t701 has been also described (Ho et al., 2010). The MRSA strain was susceptible to other antibiotics tested, presented SCCmec type IVc and *agr* type I. All these characteristics are associated with CA-MRSA, which is in accordance with the carrier of this strain who did not have any contact with hospital setting.

Fifty-two healthy individuals were carriers of MSSA isolates. It is interesting to remark the high genetic diversity of *spa* types among these isolates (37 different *spa* types, 5 of them new). As for this aspect, other studies have found similar results (Sakwinska et al., 2009; Karim et al., 2010). Analyzing the *spa* types detected, most of them are related to CC30, and other predominant CCs identified in our study were CC5, CC15, and CC45. The CC30 and CC45 seem to have evolved as successful pandemic colonizers of humans (Melles et al., 2008).

Most of our 52 MSSA strains (73.6%) showed susceptibility to all antibiotics tested except penicillin. Eleven strains exhibited erythromycin and clindamycin resistance. This could be explained by the wide use of macrolides and lincosamides in the treatment of Gram-positive infections (Lim et al., 2002). In addition, 2 strains were resistant to ciprofloxacin, but mutations at the QRDR region of *grrA* and *gyrA* genes were only detected in one of them.

All *S. aureus* (both MSSA and MRSA) were PVL-negative. PVL-positive MSSA and MRSA have been described among nasal strains recovered from healthy people (Muttaiyah et al., 2010). The *lukS-lukF* genes encoding the PVL toxin are located in phages, and it is believed that these genes could be transferred from MSSA into CA-MRSA (Deurenberg et al., 2009a). For this reason, it is of high importance to study the presence of this toxin in MSSA strains obtained from nasal carriers. Interestingly, 15 MSSA strains harbored the TSST-1 toxin gene (28.3%). TSST-1 is a toxin related with the toxic shock syndrome, a severe systemic illness. This virulence factor has also been detected in healthy individuals at similar rates to the one detected in our study (20–30%) (Mégevand et al., 2010). Most of the *tst*-positive strains (11 of 15, 73%) belonged to the clonal complex CC30. This clonal complex is considered one of the most

frequent *S. aureus* lineages detected either as colonizer or causing infections, and it may have evolved to be very successful in human colonization (van Belkum et al., 2009). The association between TSST-1 and CC30 has been previously described (Deurenberg et al., 2009b). In our study, 9 of the *tst*-positive isolates were typed as ST30, one as ST34, and one as ST1731. ST1731 is a new ST, which presents a new *pta* allele (186) with one point mutation. The detection of a new ST included in CC30 as well as the presence of more than 100 STs ascribed to this CC so far; indicate the high spread of this *S. aureus* clonal lineage. This fact and its capacity to produce TSST-1 call for an in-depth study of CC30 strains. *Spa* type t012 is the suggested founder of this clonal complex (Deurenberg et al., 2009b). Six of our 53 *S. aureus* strains presented this *spa* type and two of our *tst*-positive CC30 strains were ascribed to *spa*-t012.

Moreover, 2 strains (3.8%) carried the *eta* gene, encoding the exfoliative toxin A, and were ascribed to CC121 and CC109. There is a subclass of *S. aureus* CC121 strains which produces *eta* and/or *etb* genes. These strains are able to cause staphylococcal scalded skin syndrome and impetigo (Masiuk et al., 2010). In addition, CC121 was detected in 2 other strains without *tst-1*, *eta*, or *etb* genes.

Most of the strains were positive for *hla* and *hld* genes, and high percentages of the strains were also positive for other hemolysins (*hly*, *hlg*, and *hlg-2*). These toxins are produced by a large amount of the *S. aureus* strains (Dinges et al., 2000).

Overall, 37 (69.8%) strains were positive for at least one SE gene. The *egc* superantigen genes (SAGs) were the most predominant and were detected in 32 (60.4%) strains. Two of these strains presented the *egc* operon including *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, and *seo*, and 12 strains showed an *egc*-like operon, which also included the *seu* gene. The remaining 18 strains were evidenced for *egc*-like operon without *seo* gene. Incomplete *egc* clusters lacking one or more genes have previously been reported (Smyth et al., 2005; Blaiotta et al., 2006). *Egc* SAGs seem to be linked to the clonal background (Holtfreter et al., 2007), and in our study, most of the isolates belonged to CC30. In addition, all *tst*-positive MSSA CC30 strains obtained presented the *egc* cluster with or without *seo* gene.

Other staphylococcal SAGs related with some specific CCs in other studies were *sec-sel* and *sed-sej-ser* (Holtfreter et al., 2007). *Sec-sel* was detected in 2 strains belonging to CC45 and CC97 (Table 2). It is believed that there is a relation between CC45 and a *S. aureus* pathogenicity island where *sec-sel* is located. Moreover, *sed-sej-ser* was detected in 2 strains ascribed to CC5. Otherwise, although single *sea* seems to present a broader distribution (Holtfreter et al., 2007), all of our strains with this SAG were related to CC30.

It is interesting to remark the detection of 3 MSSA isolates with *seh*, which has been found on the antibiotic resistance cassette SCC with and without *mecA* gene (Noto and Archer, 2006). One of our strains belonged to ST1/t127. ST1 has been associated with a CA-MRSA clone (USA400), which was firstly detected in the USA in the 1990s. However, it seems that this clone is emerging in some European countries (Otter and French, 2008; Aspiroz et al., 2010; EFSA, 2009b). Strains belonging to USA400 have usually been shown to present *sea*, *sec*, *seh*, and *sek* enterotoxin genes (Shukla et al., 2010). The MSSA ST1/t127 detected in the present study possessed *sea-sek-seq* and *seh* genes.

Moreover, all *S. aureus* strains isolated were negative for exfoliative B and D toxin genes. In general, the prevalence of these toxins in *S. aureus* is very low (Becker et al., 2003).

It is interesting to remark the detection of two MSSA strains belonging to the specific clone CC398. This CC is associated to food-producing animals, especially pigs. Pigs, veal calves, and broilers can be colonized and, in a few cases, infected by *S. aureus* CC398. An important characteristic of these strains is that most of them are resistant to all beta-lactams (MRSA) and tetracycline.

Although its origin is unknown, the use of some antibiotics such as cephalosporins and tetracycline may have had a remarkable role in the selection of *S. aureus* CC398 (EFSA, 2009a). However, the 2 strains isolated in this study were susceptible to both antimicrobial agents. There are some studies in which MSSA CC398 have been detected (Cuny et al., 2009; Pan et al., 2009; Rasigade et al., 2010). Currently, it is unknown whether these strains are susceptible ancestors of MRSA CC398 or, conversely, they were MRSA CC398 and lost the SCC*mec* element (Cuny et al., 2009). There is a broad set of *S. aureus* ST398 *spa* types, but the most frequently found in animals are t011, t108 and t034 (EFSA, 2009b). The *spa* types obtained in our study have been rarely reported in human and animals (Köck et al., 2009; Loeffler et al., 2009; van Belkum et al., 2008), but the *spa* type t571 has been recently associated to a case of lethal necrotizing pneumonia (Rasigade et al., 2010).

Due to the high prevalence of *S. aureus* CC398 in food producing animals, people in direct contact with these animals are at risk of colonization and infection by this microorganism (EFSA, 2009a). Nowadays, the number of cases of human infections caused by *S. aureus* CC398 is increasing in some European countries (Pan et al., 2009; Aspiroz et al., 2010). Nevertheless, in this study, both strains were recovered from healthy individuals without risk factor or contact with animals. In addition, these strains harbored the *erm*(T) resistance gene. This gene, previously detected in other genera, has been recently described for the first time in staphylococci among MRSA CC398 strains of porcine origin (Kadlec and Schwarz, 2010; Gómez-Sanz et al., 2010).

Moreover, 2 of our MSSA strains with the new *spa* type t6647 were ascribed to ST97, included in CC97. *S. aureus* CC97 is also related with animals, in this case with ruminants, mainly cattle (Rabello et al., 2007), being responsible in most cases for bovine mastitis, and it has recently been detected in pigs (Gómez-Sanz et al., 2010; EFSA, 2009b). Moreover, MRSA CC97 has been identified in clinical human isolates in the United Kingdom and the USA (Sung et al., 2008; Chung et al., 2004). *S. aureus* CC97 strains obtained in this study were isolated from people without contact with animals, and both strains were susceptible to all tested antimicrobial agents.

A moderate rate of *S. aureus* carriage and very low prevalence of MRSA was detected in healthy people in Spain. Nevertheless, a very high genetic diversity has been shown among recovered *S. aureus* with new *spa* types and STs obtained. Most studied *S. aureus* were susceptible to all antimicrobial agents, and all of them were PVL-negative. However, *tst*- and *eta*-positive strains were isolated. Moreover, *S. aureus* CC398 and CC97 were detected in people without contact with animals. More studies should be conducted in the future to gain knowledge in the genetic lineages of *S. aureus* circulating among healthy people as well as in the capacity of these strains to produce virulence factors in order to understand the complex evolution of *S. aureus* and MRSA infections.

Acknowledgments

This work was supported by Project SAF2009-08570 from the Ministry of Education and Science of Spain and FEDER. C. Lozano and D. Benito have a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and E. Gómez-Sanz a fellowship from the Gobierno de La Rioja of Spain.

References

- Armand-Lefevre, L., Ruimy, R., Andreumont, A., 2005. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 711–714.
- Aspiroz, C., Lozano, C., Vindel, A., Lasarte, J.J., Zarazaga, M., Torres, C., 2010. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 157–159.
- Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weillert, M., Peters, G., Von Eiff, C., 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins

- among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1434–1439.
- Ben Slama, K., Gharsa, H., Klibi, N., Jouini, A., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C., 2011. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy humans with different levels of contact with animals in Tunisia: genetic lineages, methicillin resistance, and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 499–508.
- Blaioita, 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.
- Bloomfield, S.F., Cookson, B.D., Falkner, F.R., Griffith, C., Cleary, V., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clostridium difficile*, and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: assessing the problem and controlling the spread. *Am. J. Infect. Control.* 35, 86–88.
- Chung, M., Dickinson, G., De Lencastre, H., Tomasz, A., 2004. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J. Clin. Microbiol.* 42, 542–547.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement. M100-S19. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Cuny, C., Nathaus, R., LAYER, F., Strommenger, B., Altmann, D., Witte, W., 2009. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS One* 4, e6800.
- Deurenberg, R.H., Beisser, P.S., Visschers, M.J., Driessen, C., Stobberingh, E.E., 2009a. Molecular typing of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates collected in the Yogyakarta area in Indonesia, 2006. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 92–94.
- Deurenberg, R.H., Rijnders, M.I., Sebastian, S., Welling, M.A., Beisser, P.S., Stobberingh, E.E., 2009b. 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.* 65, 116–122.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16–34.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2009a. Assessment of the public health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA J.* 993, 1–73.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2009b. 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 European Food Safety Authority. *EFSA J.* 7, 1376.
- Frank, D.N., Feazel, L.M., Bessesen, M.T., Price, C.S., Janoff, E.N., Pace, N.R., 2010. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLoS One* 5, e10598.
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Fernández-Pérez, R., Spiroz, 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.
- 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.
- Ho, P.L., Lo, P.Y., Chow, K.H., Lau, E.H.Y., Lai, E.L., Cheng, V.C.C., Kao, R.Y., 2010. Vancomycin MIC creep in MRSA isolates from 1997 to 2008 in a healthcare region in Hong Kong. *J. Infect. Dis.* 60, 140–145.
- Holtfreter, S., Grumann, D., Schmutte, M., Nguyen, H.T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Steinmetz, I., Witte, W., Bröker, B.M., 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2669–2680.
- Hwang, S.Y., Kim, S.H., Jang, E.J., Kwon, N.H., Park, Y.K., Koo, H.C., Jung, W.K., Kim, J.M., Park, Y.H., 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.
- Jarraud, S., Mougél, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70, 631–641.
- Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougél, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G., 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 166, 669–677.
- Kadlec, K., Schwarz, S., 2010. 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.* 54, 915–918.
- Kluytmans, J., van Belkum, A., Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 505–520.
- Köck, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L.H., Witte, W., Deurenberg, R.H., Voss, A., Becker, K., Friedrich, A.W., 2009. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 1375–1382.
- Lim, J.A., Kwon, A.R., Kim, S.K., Chong, Y., Lee, K., Choi, E.C., 2002. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 489–495.
- Lina, G., Piémont, F., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., 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.
- Loeffler, A., Kearns, A.M., Ellington, M.J., Smith, L.J., Unt, V.E., Lindsay, J.A., Pfeiffer, D.U., Lloyd, D.H., 2009. First isolation of MRSA ST398 from UK animals: a new challenge for infection control teams? *J. Hosp. Infect.* 72, 269–271.
- Lozano, C., Spiroz, C., Lasarte, J.J., 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. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 34, pp. e1–7.
- Lozano, C., López, M., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., Zarazaga, M., 2009. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1325–1326.
- Masiuk, H., Kopron, K., Grumann, D., Goerke, C.R., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Bröker, B., Holtfreter, S., 2010. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1527–1535.
- Mégevand, C., Gervaix, A., Heininguer, U., Berger, C., Aebi, C., Vaudaux, B., Kind, C., Gnehm, H.P., 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.
- Melles, D.C., Tenover, F.C., Kuehnert, M.J., Witsenboer, H., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A., 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.
- Mertz, D., Frei, R., Periat, N., Zimmerli, M., Battagay, M., Flückiger, U., Widmer, A.F., 2009. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Arch. Intern. Med.* 169, 172–178.
- Monecke, S., Luedicke, C., Slickers, P., Ehrlich, R., 2009. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 1159–1165.
- Muttaiyah, S., Coombs, G., Pandey, S., Reed, P., Ritchie, S., Lennon, D., Roberts, S., 2010. Incidence, risk factors and outcome of Panton-Valentine leukocidin positive methicillin-susceptible. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3470–3474.
- Noto, M.J., Archer, G.L., 2006. 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.* 50, 2782–2788.
- Otter, J.A., French, G.L., 2008. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 670–676.
- Pan, A., Battisti, A., Zoncada, A., Bernieri, F., Boldini, M., Franco, A., Giorgi, M., Iurescia, M., Lorenzotti, S., Martinotti, M., Monaci, M., Pantosti, A., 2009. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 845–847.
- Rabello, R.F., Moreira, B.M., Lopes, R.M., Teixeira, L.M., Riley, L.W., Castro, A.C., 2007. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J. Med. Microbiol.* 56, 1505–1511.
- Rasigade, P.P., Laurent, F., Hubert, P., Vandenesch, F., Etienne, J., 2010. Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 *Staphylococcus aureus* strain. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1330.
- Sakwinska, O., Kuhn, G., Balmelli, C., Francioli, P., Giddey, M., Perreten, V., Riesen, A., Zysset, F., Blanc, D.S., Moreillon, P., 2009. Genetic diversity and ecological success of colonizing *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 175–183.
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Said-Salim, B., Lina, G., Matsuka, A., Martinez, J., Kreiswirth, B.N., 2003. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* 41, 456–459.
- Shopsin, B., Mathema, B., Martinez, J., Ha, E., Campo, M.L., Fierman, A., Krasinski, K., Kornblum, J., Alcabes, P., Waddington, M., Riehman, M., Kreiswirth, B.N., 2000. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the Community. *J. Infect. Dis.* 182, 359–362.
- Shukla, S.K., Karow, M.E., Brady, J.M., Stemper, M.E., Kislow, J., Moore, N., Wroblewski, K., Chyou, P.H., Warshauer, D.M., Reed, K.D., Lynfield, R., Schwan, W.R., 2010. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3582–3592.
- Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J., 2005. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J. Med. Microbiol.* 54, 401–411.
- Sung, J.M., Lloyd, D.H., Lindsay, J.A., 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 154, 1949–1959.
- van Belkum, A., Melles, D.C., Nouwen, J., van Leeuwen, W.B., van Wamel, W., Vos, M.C., Wertheim, H.F.L., Verbrugh, H.A., 2009. Coevolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 9, 32–47.
- van Belkum, A., Melles, D.C., Peeters, J.K., van Leeuwen, W.B., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., Spalburg, E., de Neeling, A.J., Verbrugh, H.A., 2008. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 479–483.
- 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.

High prevalence of *spa* types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital

Carmen Lozano¹, Antonio Rezusta^{2,3}, Paula Gómez¹, Elena Gómez-Sanz¹, Natalia Báez², Gloria Martín-Saco^{2,3}, Myriam Zarazaga¹ and Carmen Torres^{1*}

¹Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain; ²Servicio Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ³IIS Aragón, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-941299750; Fax: +34-941299721; E-mail: carmen.torres@unirioja.es

Received 1 August 2011; returned 30 August 2011; revised 21 October 2011; accepted 1 November 2011

Objectives: The clonal lineages, resistance mechanisms and virulence traits of tetracycline-resistant (Tet^R) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in a Spanish hospital during 2009 and 2010 were investigated.

Methods: Fifty-two Tet^R MRSA strains from unrelated patients were included in this study. Susceptibility to 26 antimicrobial agents was determined and 24 resistance genes were tested for by PCR. The sequences of the genes *grlA* and *gyrA* were analysed in all ciprofloxacin-resistant MRSA isolates. For all strains, *spa*, SCCmec and *agr* typing was implemented. Multilocus sequence typing was performed for 16 representative strains of the different *spa* types. The presence of the genes *tst*, *lukF/lukS-PV*, *eta*, *etb*, *etd* and *cna* was investigated by PCR.

Results: Fifteen different *spa* types, four of them new ones, were detected among the 52 strains, being associated with the following clonal complexes (CCs): CC398 (67.3%), CC1 (11.5%), CC5 (11.5%) and CC8 (9.6%). A novel sequence type (ST), ST2077, belonging to CC398 was identified. Most MRSA CC398 strains were typed as SCCmecV-*agr*I. In addition to β -lactam resistance, isolates showed resistance to (gene/number of strains): tetracycline [*tet*(K)/36, *tet*(L)/8 and *tet*(M)/48], macrolides and lincosamides [*erm*(B)/6, *erm*(C)/25, *erm*(T)/2, *msr*(A)/*msr*(B)/4 and *mph*(C)/4], aminoglycosides [*aac*(6')-Ie-aph(2')-Ia/8, *ant*(4')-Ia/13 and *aph*(3')-IIIa/15], trimethoprim [*dfr*S1/2 and *dfr*K/3] and mupirocin (*mupA*/3). Strains investigated for mutations mediating quinolone resistance revealed an S80F exchange in *GrlA* and different changes in *GyrA*. Three strains were Panton–Valentine leucocidin-positive (ST8 and ST94) and 41 strains were *cna*-positive. All MRSA isolates were negative for the genes *tst*, *eta*, *etb* and *etd*.

Conclusions: Tetracycline resistance could be a good marker for MRSA CC398, although this resistance can also be found in other lineages.

Keywords: animal origin, CC1, PVL

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates of sequence type (ST) 398 and other STs belonging to the clonal complex (CC) 398 have emerged in recent years. These isolates are known as livestock-associated (LA-MRSA) because farm animals, especially pigs, represent an important reservoir. Humans in close contact with pigs, such as farmers, are often colonized, and occupational exposure to animals is considered a risk factor for MRSA carriage.^{1,2} The use of antimicrobial agents in pig farming may have played an important role in the selection of these strains, since MRSA CC398 usually presents

resistance to tetracycline, which is one of the antimicrobials mainly used in this industry.^{3,4} Little information is available about the percentage of this clone in human infections, but so far most cases seem to be located in The Netherlands, Belgium, Denmark, Germany and Austria.⁵ MRSA CC398 strains are mainly associated with skin and soft tissue infections, but have also been involved in severe infections.⁶ Rapid detection is necessary in hospitals because the number of infections caused by this clonal lineage could be increasing and a hospital outbreak of MRSA CC398 (ST398) has already been reported.³ The aim of this study was to analyse the clonal lineages, resistance mechanisms and virulence traits of tetracycline-resistant (Tet^R)

MRSA strains isolated in a Spanish hospital during 2009 and 2010, and to determine whether Tet^R could be a good marker to detect MRSA CC398.

Materials and methods

Selection of the strains

Fifty-eight Tet^R MRSA strains were isolated from unrelated patients in Miguel Servet University Hospital during 2009 and 2010, representing 8.2% of all MRSA recovered during this period. This hospital has 1300 beds and serves a population of ~400000 inhabitants in both urban and rural areas. Fifty-two of these Tet^R MRSA were included in this study for genetic characterization. The origin of these strains was as follows: wound and exudates ($n=20$), aspirate ($n=14$), nasal swabs ($n=11$), blood ($n=5$), pleural fluid ($n=1$) and urine ($n=1$).

Susceptibility testing and resistance genes

Susceptibility to antimicrobial agents was determined using the Microscan[®] system (for ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, imipenem, penicillin, oxacillin, tetracycline, azithromycin, erythromycin, clindamycin, quinupristin/dalfopristin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, gentamicin, fosfomicin, co-trimoxazole, linezolid, rifampicin and teicoplanin), Etest (for vancomycin) and agar disc diffusion (for cefoxitin, kanamycin, tobramycin, mupirocin and fusidic acid) (CLSI). The presence of the resistance genes *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(T), *msr*(A), *msr*(B), *mph*(C), *lnu*(A), *cfr*, *vga*(C), *lsa*(B), *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *aac*(6')-aph(2''), *ant*(4')-Ia, *aph*(3')-IIIa, *dfr*S1, *dfr*D, *dfr*G, *dfr*K and *mupA* was tested for by PCR.^{6,7} Mutations in quinolone targets were determined by sequence analysis of the genes *griA* and *gyrA* of the ciprofloxacin-resistant MRSA isolates.⁶ For the linezolid-resistant

strain, the presence of mutations in the V region of 23S rRNA was investigated by PCR and sequence analysis.⁸

Typing of strains and virulence genes

All MRSA strains were typed (*spa*, *SCCmec* and *agr* typing) as previously described.⁷ Multilocus sequence typing (MLST) was performed for 16 representative MRSA strains (one of each *spa* type detected and all strains with new *spa* types) by PCR and partial sequencing of seven *S. aureus* housekeeping genes (www.saureus.mlst.net) to determine the ST and the CC. The CCs of the isolates were assigned according to the ST determined and/or *spa* type detected. The presence of virulence genes *lukF/lukS*-PV, *tst*, *eta*, *etb*, *etd* and *cna* was investigated by PCR.^{2,7}

Results and discussion

Fifteen different *spa* types were detected among 52 Tet^R MRSA isolates. According to the ST determined (16 strains) and/or the *spa* type/s detected (all strains), the MRSA strains were assigned to four CCs: CC398 (67.3% of strains), CC1 (11.5%), CC5 (11.5%) and CC8 (9.6%) (Table 1).

Thirty-five Tet^R MRSA strains were assigned to the lineage CC398 and presented eight different *spa* types (number of strains): t011 (24), t899 (1), t1197 (3), t1451 (1), t3934 (2) and three new ones registered as t7577 (1), t8100 (1) and t8409 (2). MLST was performed for 9 of these 35 strains (1 of each *spa* type detected and the 4 isolates with new *spa* types). Most of these strains (seven out of nine) were typed as ST398. The remaining two strains (t8100 and t8409) presented a new ST, registered as ST2077 (a single-locus variant of ST398 with a

Table 1. Molecular typing of the 52 Tet^R MRSA isolates included in the study

Number of strains	<i>spa</i> type	ST ^a	CC ^b	<i>SCCmec</i>	<i>agr</i>	Origin (number of strains)
24	t011	ST398	CC398	V	I	aspirate (10), wound (7), nasal swabs (4), blood (1), pleural liquid (1), urine (1)
1	t899	ST398	CC398	IV	I	aspirate (1)
3	t1197	ST398	CC398	V	I	wound (2), nasal swabs (1)
1	t1451	ST398	CC398	V	I	nasal swabs (1)
2	t3934	ST398	CC398	V	I	nasal swabs (2)
1	t7577 ^c	ST398	CC398	V	I	blood (1)
1	t8409 ^c	ST398	CC398	V	I	aspirate (1)
1	t8100 ^c	ST2077 ^d	CC398	IV	I	wound (1)
1	t8409 ^c	ST2077 ^d	CC398	V	I	nasal swabs (1)
5	t127	ST1	CC1	IV	III	wound (2), aspirate (1), nasal swabs (1), vagina (1)
1	t1381	ST1	CC1	IV	III	wound (1)
1	t002	ST5	CC5	IV	II	wound (1)
3	t067	ST125	CC5	IV	II	wound (2), aspirate (1)
2	t2220	ST125	CC5	IV	II	blood (1), wound (1)
4	t008	ST8	CC8	IV	I	wound (2), blood (1), nasal swabs (1)
1	t7613 ^c	ST94	CC8	NT	I	blood (1)

NT, non-typeable.

^aMLST was performed for one strain per *spa* type and for both isolates with the new *spa* type t8409.

^bCC was assigned according to the ST determined and/or the *spa* type detected.

^cNew *spa* type.

^dNew ST.

Table 2. Phenotype and genotype of antimicrobial resistance of the 52 Tet^R MRSA isolates included in the study in relation to the CC and *spa* type^a

CC ^b / <i>spa</i> type	Number of strains	Virulence genes	Antimicrobial resistance phenotype ^c	Tetracycline resistance genes	Other resistance genes	Amino acid changes in GrlA/GyrA (number of strains)
CC398/t011	5	<i>cna</i>	OXA-TET	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)		ND
	5	<i>cna</i>	OXA-TET-CIP	<i>tet</i> (K) ⁴ , <i>tet</i> (M)		S80F/S84L (4), S80F/S84A (1)
	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	ND
	3	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP-GEN ²	<i>tet</i> (K) ² , <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2')-Ia ²	S80F/S84L (2), S80F/wild (1)
	4	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-GEN ² -TOB-KAN-SXT ¹	<i>tet</i> (K) ³ , <i>tet</i> (L) ¹ , <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2')-Ia ² , <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa ² , <i>dfr</i> K	ND
	2	<i>cna</i>	OXA-TET-CIP-TOB-KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L) ¹ , <i>tet</i> (M)	<i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa ¹	S80F/S84L (2)
	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP-TOB-KAN-SXT-LZD ¹	<i>tet</i> (L)	<i>erm</i> (C), <i>erm</i> (T), <i>dfr</i> K	S80F/S84L (1)
	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CIP-MUP	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B), <i>mup</i> A	S80F/S84L (1)
	2	<i>cna</i>	OXA-TET-CLI-CIP-GEN ¹ -TOB ¹ -KAN ¹	<i>tet</i> (K) ¹ , <i>tet</i> (M)	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2')-Ia ¹ , <i>ant</i> (4')-Ia ¹	S80F/S84L (2)
	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP-TOB-KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia	S80F/wild (1)
CC398/t899	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP-TOB-KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	S80F/E88G (3)
CC398/t1197	3	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP-FUS ¹	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	S80F/S84L (1)
CC398/t1451	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C) ¹	ND
CC398/t3934	2	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY ¹ -CLI ¹	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	S80F/S84L (1)
CC398/t7577	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-CIP	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	ND
CC398/t8100	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-GEN-TOB-KAN-SXT	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>dfr</i> K	ND
CC398/t8409	2	<i>cna</i>	OXA-TET	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)		ND
CC1/t127	1	<i>cna</i>	OXA-TET-GEN-TOB-KAN	<i>tet</i> (K)	<i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2')-Ia	ND
	4	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI ¹ -CIP ¹ -TOB ¹ -KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L) ¹ , <i>tet</i> (M) ²	<i>erm</i> (B) ¹ , <i>erm</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia ¹ , <i>aph</i> (3')-IIIa	S80F/S84L (1)
CC1/t1381	1	<i>cna</i>	OXA-TET-ERY-CLI-KAN	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa	ND
CC5/t002	1		OXA-TET-ERY-CIP	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C)	S80F/S84L (1)
CC5/t067	3		OXA-TET-ERY-CLI-CIP ² -GEN ¹ -TOB ² -KAN-SXT ² -MUP ¹	<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B) ² , <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B) ² , <i>mph</i> (C) ¹ , <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2')-Ia ¹ , <i>ant</i> (4')-Ia ¹ , <i>aph</i> (3')-IIIa ² , <i>dfr</i> S1 ² , <i>mup</i> A ¹	S80F/S84L (2)
CC5/t2220	2		OXA-TET-ERY-CLI-CIP-TOB ¹ -KAN-MUP ¹	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (B) ¹ , <i>erm</i> (C) ¹ , <i>msr</i> (A)/ <i>msr</i> (B), <i>mph</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia ¹ , <i>aph</i> (3')-IIIa, <i>mup</i> A ¹	S80F/S84L (2)
CC8/t008	2	<i>lukF/lukS-PV</i>	OXA-TET	<i>tet</i> (K) ¹ , <i>tet</i> (M) ¹		ND
	2		OXA-TET-TOB-KAN	<i>tet</i> (L) ¹ , <i>tet</i> (M)	<i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-IIIa	ND
CC8/t7613	1	<i>lukF/lukS-PV</i>	OXA-TET-ERY-KAN	<i>tet</i> (M)	<i>erm</i> (C), <i>aph</i> (3')-IIIa	ND

ND, not determined.

^aIn some cases, only some of the isolates of the group presented the characteristic indicated, and the number of isolates with this characteristic is indicated as a superscript.

^bCC was assigned according to the ST determined and/or *spa* type detected.

^cTET, tetracycline; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; SXT, co-trimoxazole; MUP, mupirocin; FUS, fusidic acid; LZD, linezolid; I, intermediate; i, inducible.

different *gmk* allele) and belonging to CC398. Thirty-three of the 35 CC398 strains were typed as SCCmecV and *agrI*, whereas the single isolates with *spa* type t899 and t8100 were typed as SCCmecIV.

Although CC398 is mainly associated with skin and soft-tissue infections, in this study MRSA CC398 was detected in samples of different origins (Table 1). Most of these strains were from skin or respiratory tract samples, although in four cases (11.4%) the samples were obtained from blood, pleural fluid and urine.

Other CCs detected in this study were as follows (number of strains): CC1 (6), CC5 (6) and CC8 (5). MRSA strains assigned to CC1 showed the *spa* types t127 (five strains) and t1381 (one strain), and all of them were typed as SCCmecIV and *agrIII*. MRSA strains assigned to CC5 presented the *spa* types t002 (one strain), t067 (three strains) and t2220 (two strains), SCCmecIV and *agrII*. Two STs (ST5 and ST125), both belonging to CC5, were detected when three representative strains (one of each *spa* type) were typed by MLST. MRSA strains assigned to CC8 presented two different *spa* types: t008 (four strains) and a new one designated t7613 (one strain). MLST for single strains of the *spa* types t008 and t7613 revealed two STs (ST8 and ST94), with ST94 being a single-locus variant of ST8. The four MRSA CC8-t008 strains were SCCmecIV and *agrI* and the MRSA CC8-ST94-t7613 strain presented a non-typeable SCCmec and *agrI*.

Most of the MRSA CC398 in this study carried the genes *tet(K)* and *tet(M)*. Only six strains with *spa* types t011, t899, t1451 and t8100 carried the *tet(L)* gene in addition to *tet(K)* and *tet(M)* (Table 2). The MRSA-t127 strains, belonging to CC1, carried either the *tet(K)* gene alone or the combination of the genes *tet(K)* and *tet(L)*. All MRSA-t067 isolates assigned to CC5 showed the combination *tet(M)/tet(K)*, while the remaining strains of CC5 were only positive for the *tet(M)* gene (Table 2).

In addition to tetracycline resistance, the MRSA strains included in this study showed resistance to other antimicrobial agents. More than half of the strains presented resistance to macrolides, lincosamides or quinolones (50%–58%) and harboured the genes *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)*, *msr(A)/msr(B)* and/or *mph(C)*. Interestingly, the *mph(C)* resistance gene was only detected in three MRSA CC5-t067 strains. Mutations in quinolone targets were studied for all ciprofloxacin-resistant MRSA strains and all of them showed the S80F amino acid change in GrlA. Different changes in GyrA were detected: 19 strains showed the change S84L, 2 strains S84A and 3 E88G. All MRSA strains with the E88G amino acid exchange in GyrA belonged to *spa* type t1197. So far, this mutation has not been reported in MRSA CC398 strains. Moreover, two strains only presented amino acid changes in GrlA, which is in agreement with the role of topoisomerase IV as the first target of quinolones in this genus.

Twenty-five MRSA strains of different clonal lineages showed resistance to aminoglycosides and harboured the *aac(6')-aph(2'')*, *ant(4')-Ia* and/or *aph(3')-IIIa* genes. Only five MRSA strains showed co-trimoxazole resistance. The two MRSA CC5 strains harboured the *dfpS1* gene and the three MRSA CC398 strains the *dfpK* gene, which was described for the first time in staphylococci in MRSA CC398 strains.⁹ Moreover, one MRSA-t011 strain assigned to CC398 showed diminished susceptibility to linezolid but the resistance gene *cfr* or mutations of the 23S rRNA gene were not detected.

Three Pantone–Valentine leucocidin (PVL)-positive non-CC398 MRSA strains (two CC8-t008 and one CC8-t7613) were detected in this collection. There are PVL-positive (USA300) and PVL-negative clones (Lyon Clone, USA500, UK12 and 16) belonging to CC8.¹⁰ In our study, one PVL-positive MRSA strain showed the ST94 (CC8-t7613), which is a single-locus variant of ST8. Few MRSA-ST94 strains have currently been detected and none of them was PVL-positive.

Otherwise, 41 strains were *cna*-positive and none of the strains included in this study presented *tst*, *eta*, *etb* and *etd* genes.

The very frequent detection of MRSA with *spa* type/s associated with CC398 among Tet^R strains in a Spanish hospital, as well as the detection of a new ST and four new *spa* types included in this CC, indicate that this clonal lineage is emerging in the hospital environment. This clonal lineage has been detected as the cause of human infections in sporadic cases related to pig farms.^{1,2} However, the number of MRSA CC398 infections has been increasing and some strains have been detected in people without risk factors.¹¹

Interestingly, the region in which the studied hospital is located shows the highest density of intensive pig farming in Spain. This fact could be relevant to the high frequency of isolates related to CC398 isolates detected in this study.

Although MRSA CC398 is less virulent than other clonal lineages,^{1,2} the multiresistance phenotype that these strains usually present limits the therapeutic options. It is an important observation that most of the MRSA CC398 strains in our study showed resistance—in addition to β -lactams and tetracyclines—to fluoroquinolones, macrolides and lincosamides. Resistance to aminoglycosides was also frequently detected.

Additionally, 11.5% of the strains belonged to CC1, which seems to be related to community-acquired MRSA isolates from humans. However, CC1-t127 is also found in animals and it has been suggested that it could represent another animal clonal lineage responsible for human diseases.¹²

In conclusion, due to the increasing public health concern about MRSA CC398, rapid detection of this lineage seems to be necessary. According to our results, tetracycline resistance could be a good initial marker for the detection of potential CC398 and other animal-related CCs, although this resistance can also be present in other lineages.

Acknowledgements

Some of these data have been previously presented as posters at an international conference (Twenty-first European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Milan, Italy, 2011; Poster number P845) and at a national congress (Fifteenth Congress of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Málaga, Spain, 2011; Poster number P497).

Funding

This study was financially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional). C. L. has a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain, P. G. has a fellowship Colabora from the Gobierno de La Rioja of Spain and E. G.-S. has a fellowship from the Gobierno de La Rioja of Spain.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Lewis HC, Mølbak K, Reese C et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 1383–9.
- 2 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.
- 3 Wulf MW, Markestein A, van der Linden FT et al. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Euro Surveill* 2008; **13**: pii=8051.
- 4 Moodley A, Nielsen SS, Guardabassi L. Effects of tetracycline and zinc on selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 398 in pigs. *Vet Microbiol* 2011; **152**: 420–3.
- 5 van Cleef BA, Monnet DL, Voss A et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans, Europe. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 502–5.
- 6 Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI et al. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 138–40.
- 7 Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C et al. 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**: 1269–77.
- 8 Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G et al. 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**: 311–7.
- 9 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* 2009; **53**: 776–8.
- 10 Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008; **8**: 747–63.
- 11 Welinder-Olsson C, Florén-Johansson K, Larsson L et al. Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 1271–2.
- 12 Franco A, Hasman H, Iurescia M et al. Molecular characterization of *spa* type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1231–5.

Genetic environment and location of the *lnu(A)* and *lnu(B)* genes in MRSA and other staphylococci from animal and human origin.

Carmen Lozano¹, Carmen Aspiroz,² Yolanda Sáenz³, Montserrat Ruiz-García⁴, Gloria Royo-García⁴, Elena Gómez-Sanz¹, Fernanda Ruiz-Larrea¹, Myriam Zarazaga¹, Carmen Torres^{1,3*}.

¹Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain; ²Laboratorio de Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain; ³Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, Logroño, Spain, ⁴Sección de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Spain.

*Corresponding author. Tel: +34-941299750; Fax: +34-941299721; E-mail: carmen.torres@unirioja.es

Received June 2012; returned July 2012; revised XX 2012

Objectives: to detect the presence of the *lnu* genes in staphylococcal strains with the unusual phenotype lincosamide-resistance/macrolide-susceptibility (L^R-M^S) and to determine their location and their genetic environments.

Methods: Six staphylococcal strains of human and animal origin with the phenotype L^R-M^S were studied. The presence of 15 resistance genes was tested by PCR. SCCmec-typing was performed in all methicillin-resistant (MR) strains. *agr*-, *spa*-typing and Multilocus Sequence Typing (MLST) were implemented in *S. aureus* strains. Transformation experiments were carried out by electroporation. Plasmid or chromosomal gene location was determined by Southern blotting analysis, and genetic environments of the *lnu* genes were studied in all strains.

Results: Three MR staphylococcal strains contained the *lnu(A)* gene in one methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ST398-t108, and one methicillin-resistant *S. sciuri* (MRSC), the presence of the pLNU1 plasmid carrying *lnu(A)* was confirmed. A novel *lnu(A)*-carrying plasmid (pUR5425) was identified in one MRSA ST125-t067 strain. Transformants of these *lnu(A)*-positive strains presented increased values of lincomycin MIC. The remaining three staphylococcal strains harbored the *lnu(B)* gene: two methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) ST9-t337 and one MRSA ST398-t011. In the two MSSA strains the *lnu(B)* was embedded in the chromosome and in the MRSA strain in a large sized plasmid. The same *lnu(B)* genetic environment was detected in these three strains.

Conclusions: The resistance phenotype L^R-M^S seems to be related to *S. aureus* animal-associated clonal lineages (ST398 and ST9). A novel *lnu(A)*-carrying plasmid was identified and it is the first detection of the *lnu(B)* gene in MRSA ST398.

Keywords: ST398, ST9, pLNU1, lincosamide resistance, *Staphylococcus aureus*, MRSA

Introduction

Lincosamides constitute a group of antibiotics employed to treat staphylococcal and streptococcal infections in human and veterinary medicine. This group is classified together with macrolides and streptogramins (group MLS) owing to the fact that they share their binding site. The main mechanism of resistance to these MLS antimicrobials in staphylococci is encoded

by *erm* genes.¹ By contrast, the *lnu* genes confer resistance only to lincosamides. Until now, five *lnu* genes have been described *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)*, and *lnu(F)*. A priori, these genes only confer resistance to lincomycin and pirlimycin, although the resistance to clindamycin has been also suggested.² Recently, the detection of an unusual resistance phenotype, lincosamide-resistance/macrolide-

susceptibility (L^R-M^S), in staphylococcal strains of animal origin has increased.^{3,4}

The aims of this study were to determine the genetic mechanism in MRSA and other staphylococcal strains which showed the unusual resistance phenotype L^R-M^S and to analyze their location and their genetic environments.

Materials and methods

Bacterial strains

Six *Staphylococcus* spp. strains were included in this study. Five of them were *S. aureus* [three methicillin-resistant and two methicillin-susceptible] and the remaining strain was methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* (MRSC). These strains were selected due to their unusual resistance phenotype L^R-M^S.

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing was performed by disc-diffusion method following the CLSI guidelines.⁵ The tested antibiotics were as follows: penicillin, oxacillin, ceftiofur, erythromycin, clindamycin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, tobramycin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomycin, teicoplanin, mupirocin and fusidic acid. In addition, the MIC of clindamycin, lincomycin, erythromycin, linezolid, tiamulin, virginiamycin and chloramphenicol was determined by the agar dilution method.^{5,6} *S. aureus* ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used as reference control strains. CLSI breakpoints were used for all antibiotics,⁵ except for lincomycin, in which breakpoints of Société Française Microbiologie were considered,⁶ and for tiamulin and virginiamycin due to the lack of officially approved breakpoints.

Resistance genotype

The presence of the *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, and *lnu(D)* genes was analyzed by PCR and sequencing (Table S1). The presence of the *vga(A)*, *vga(B)*, *vga(C)*, *vga(E)*, *lsa(B)*, *cfr*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *aacA-aphD*, *aadD*, *aphA3*, *dfrS1*, *dfrD*, *dfrG*, and *dfrK* resistance genes was studied by PCR as previously described.^{4,7}

Molecular Typing

Two of the strains (C1841 and C2944) were typed in previous studies.^{7,8} The remaining *S. aureus* strains were typed (*spa*-typing, *agr*-typing and MLST) as previously described (<http://saureus.mlst.net/>).⁷ SCC*mec*-typing was performed in all methicillin resistant (MR) strains.⁷ Moreover, due to the similar genetic

background of the two MSSA strains, PFGE was performed as recommended.⁹

Location of the *lnu* genes

Plasmid or chromosomal gene location was determined by Southern blot analysis. Two methods were used to detect the possible plasmid location: the S1-PFGE assay, and plasmid DNA extraction.^{4,10} Moreover, I-CeuI-PFGE was performed to detect the possible chromosomal location. Hybridizations were carried out with *lnu(A)* and *lnu(B)* probes and 16S rDNA probe (in the case of I-CeuI) according to the manufacturer's recommendations (Roche).

Transformation experiments and genetic environment of the *lnu(A)* gene

Transformation experiments were carried out by electrotransformation into the recipient strain *S. aureus* RN4220.¹⁰ Putative transformants were selected on Brain Heart Infusion (BHI) plates containing lincomycin (8 mg/L). The genetic environment of the *lnu(A)* genes were studied by inverse PCR and sequencing of the obtained transformants. Primers used for amplification were *lnu(A)inv-F* and *lnu(A)inv-R* (Table S1). Plasmids containing the *lnu(A)* gene were completely sequenced by primer walking using the PCR primers as the initial primers.

Genetic environment of the *lnu(B)* gene

To determine the genetic environment of the *lnu(B)* gene, primers were designed based on the previously reported pEF418 structure (GenBank accession number AF408195.1) (Table S1). In addition, whole-cell DNA of MRSA C2944 strain was digested with PvuII (New England Biolabs) and subjected to ligation with T4 ligase (Fermentas). An inverse PCR was performed using the 1_Inv-F and 2_Inv-R primers (Table S1 and Figure 1a) and the amplicon was sequenced. Due to the identification of IS257 upstream of the detected genetic structure, primers were designed to determine whether the same IS was also downstream of the *lnu(B)* gene (Table S1). Primers based on the structure detected in C2944 strain were designed and tested in C2828 and C2829. Putative circular forms were also investigated by inverse PCR and sequencing using the primers 2_Inv-R and pEF418-4-F (Table S1).

Results and discussion

In this study, MRSA strains (ST125 and ST398) of both animal and human origin and one MRSC of animal origin were detected, showing the resistance *lnu(A)* gene. Moreover, MRSA

ST398 and MSSA ST9 strains of human origin revealed the presence of the resistance *lnu(B)* gene (Table 1). PFGE on both MSSA strains revealed closely related patterns. Previous reports indicated that the MRSA lineage ST398 is a livestock associated (LA) MRSA, frequently encountered in farm animals, although it is appearing on the human population.¹¹ Another identified LA staphylococcal lineage is ST9, which has been reported in animal MRSA and MSSA.^{12,13} Moreover, one of our *lnu(A)* positive strains was MRSC and was obtained from a pig nasal sample. It seems that there is a relation between the resistance *lnu(A)* and *lnu(B)* genes and staphylococci from animal origin. This fact has been suggested before since other resistance genes responsible for the unusual resistance phenotype L^R-M^S have been detected in MRSA ST398 strains.^{3,4,14} The use of lincosamides in veterinary medicine could explain the presence of these resistance genes in strains of animal origin.⁴ In this study, the *lnu(A)* gene was also identified in a MRSA ST125 strain of human origin. The detection of this gene in a human strain is remarkable and the ST125 lineage is the most commonly found hospital-acquired MRSA clone in Spain.^{1,15}

The MIC values obtained for the *lnu(A)*-positive strains are in concordance with the results obtained by others.¹⁰ However, MRSC strain C2376 showed higher tiamulin MIC value than the remaining *lnu(A)*-positive strains (Table S2). None of the tested genes conferring tiamulin resistance was detected in the strain C2376. Only the MIC value of lincomycin was increased in transformant strains with respect to the recipient strain (Table S2).

The three *lnu(B)*-positive strains presented higher MIC values for lincomycin, clindamycin and tiamulin than *lnu(A)*-positive strains (Table S2). The Lnu(A) protein modifies a hydroxyl group of clindamycin and lincomycin at positions 3 and 4, respectively. Nevertheless, the Lnu(B) protein modifies a hydroxyl group at position 3 in both antimicrobials.² This fact and the presence of a gene encoding an ABC transporter upstream of the *lnu(B)* gene (Figure 1a) could explain the phenotype detected. Interestingly, this ABC transporter showed a similarity of 76.5% with respect to the staphylococcal Lsa(B) protein.¹⁶

Hybridization revealed the location of the *lnu(A)* gene in small plasmids (from 2.3 to 2.7 kb). Sequencing of the inverse-PCR products showed that the MRSA ST398 strain and the MRSC strain harboured a *lnu(A)*-plasmid identical to pLNU1 (with a GC content of 29% and a size of 2361 bp) of *S. chromogenes* (GenBank AM184099.1).

The MRSA ST125 strain presented a novel plasmid (pUR5425) of 2690 bp, 31% of GC content, and with a high similarity (92.8%) with the previously described plasmid pLNU4 (AM184102.1). The novel plasmid was included into GenBank (accession number JQ861958). The most notable differences between pUR5425 and pLNU4 were the presence of amino acid changes in the Rep protein, and several variations in the region between the *rep* gene and the single-strand origin (Figure 1b). The Lnu(A) protein encoded by the plasmids detected in this study presented some amino acid exchanges. Variability on the Lnu(A) amino acid sequence has been already described.¹⁰

No transformants were obtained for *lnu(B)*-positive strains. Few data exist on the location of the *lnu(B)* gene and on its genetic environment. Plasmid location (about 240 kb) was suggested in the first description of this gene.¹⁷ Additionally, in that referred study, it was observed that the *lnu(B)* gene could be integrated into the chromosome of the obtained transconjugant. These results are in agreement with our observation since this gene was embedded in the chromosome in the two MSSA strains and in a large sized plasmid (250 kb) in the MRSA strain C2944. Up to now, only a partial sequence of one *lnu(B)*-carrying plasmid (pEF418) of *E. faecalis* was available on GenBank. The region that immediately preceded the *lnu(B)* gene was homologous to pEF418 and this region included other resistance genes such as *aadE* or *spc* (Figure 1a). Moreover, two insertion sequences (both IS257) flanked the structure detected and a circular structure was identified (Figure 1a). This fact indicates that the lateral transfer could occur possibly mediated by the presence of the two ISs that would enable the mobilization of the *lnu(B)* gene. Further studies are required to confirm this hypothesis. The genetic environment of the *lnu(B)* gene detected in strain C2944 was also identified in the other two *lnu(B)*-positive strains and was submitted to GenBank (accession number JQ861959).

The transference of resistance genes among bacterial genera and species has been corroborated in this study. Firstly, two of the *lnu(A)* positive strains (one MRSA and one MRSC) contained this gene in the plasmid pLNU1, which was earlier described in *S. chromogenes*.¹⁰ The transference of this gene among different staphylococcal species is expected since the *lnu(A)* gene has been detected in *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, and *S. epidermidis*.^{8,10,18} Moreover, the *lnu(B)* gene was identified in three *S. aureus* strains in this

Table 1. Characteristics of *Staphylococcus* spp. strains included in this study.

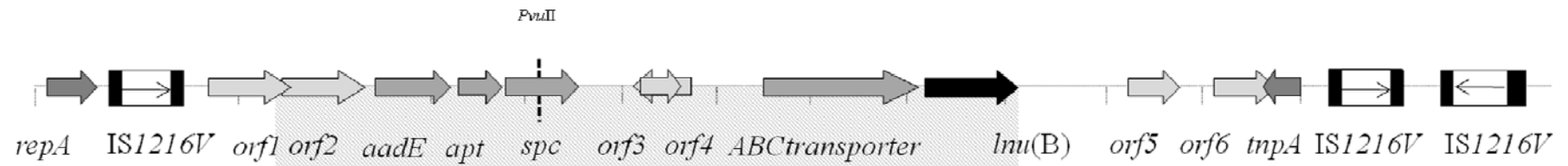
Strain	Species Methicillin resistance ^a	Date of isolation	Sample origin	MLST/ <i>spa</i>	SCC <i>mec agr</i>	Phenotype of resistance ^{b,c}	Genotype of resistance	Location of <i>lnu</i> genes	GenBank number	
C1841	MRSA	January 2009	Nasal-pig	ST398/t108	V	I	PEN-OXA-FOX-CLI ¹ - LIN-TET-SXT	<i>lnu(A), mecA, tet(L), dfrK</i>	pLNU1-Plasmid (2.3 kb)	AM184099.1
C5425	MRSA	August 2009	Unknown-human	ST125/t067	IV	II	PEN-OXA-FOX-LIN-CIP	<i>lnu(A), mecA</i>	pUR5425-Plasmid (2.7 kb)	JQ861958.1 new
C2376	MRSC	August 2009	Nasal-pig	-	III	-	PEN-OXA-FOX-CLI ¹ - LIN-TET-FUS ¹	<i>lnu(A), mecA, tet(L)</i>	pLNU1-Plasmid (2.3 kb)	AM184099.1
C2828	MSSA	December-2009	Skin lesion-human	ST9/t337	-	II	PEN-CLI-LIN-TET-STR- GEN-KAN-TOB-CIP	<i>lnu(B), tet(K), tet(L), aacA- aphD, aadD</i>	Chromosome	JQ861959.1 new
C2829	MSSA	January-2010	Skin lesion-human	ST9/t337	-	II	PEN-CLI-LIN-TET-STR- GEN-KAN-TOB-CIP	<i>lnu(B), tet(L), aacA-aphD, aadD</i>	Chromosome	JQ861959.1 new
C2944	MRSA	January-2009	Ear swab lesion-human	ST398/t011	V	I	PEN-OXA-FOX-CLI- LIN-TET-STR-GEN- KAN-TOB-CIP	<i>lnu(B), mecA, tet(M), aacA- aphD</i>	Plasmid (250 kb)	JQ861959.1 new

^aMRSA, methicillin resistant *S. aureus*; MRSC, methicillin resistant *S. sciuri*; MSSA, methicillin susceptible *S. aureus*

^bPEN, penicillin; OXA, oxacillin; FOX, cefoxitin; CLI, clindamycin; LIN, lincomycin; TET, tetracycline; STR, streptomycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; TOB, tobramycin; FUS, fusidic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CIP, ciprofloxacin; I, intermediate.

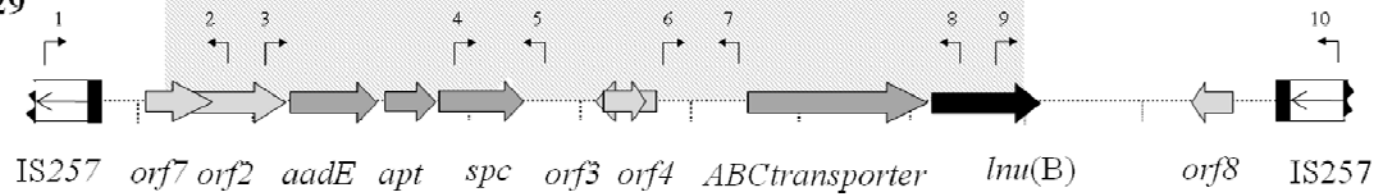
^cCLSI breakpoints were used for all antibiotics, except for lincomycin in which CA-SFM breakpoint were considered.

a) **pEF418**
(AF408195.1)



(JQ861959.1)

C2944
C2828
C2829



b)

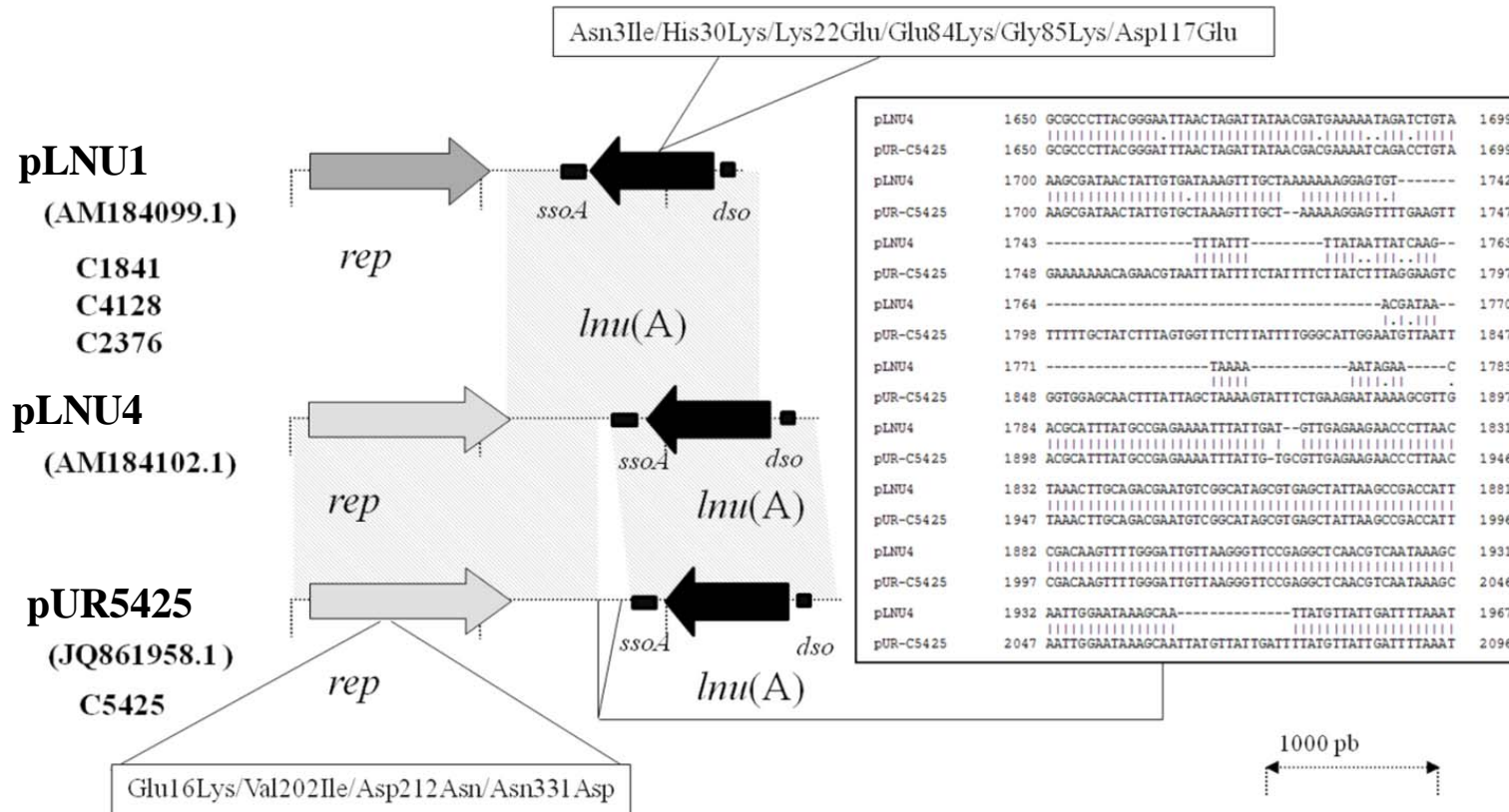


Figure 1. Figure 1a: structure of the novel genetic environment of the *lnu(B)* gene (strain C2944) and the structure of the already described *Enterococcus* plasmid pEF418. The PvuII cleavage site is shown. The positions of primers used to amplify the genetic environment of the *lnu(B)* gene are indicated by arrows and numbers as follows: 1: C2944-tnp-F, 2: 2_inv-R, 3: 1_inv-F, 4: pEF418-2-F, 5: pEF418-3-R, 6: pEF418-1-F, 7: pEF418-2-R, 8: pEF418-1-R, 9: pEF418-4-F, 10: IS257-R. Figure 1b: structure of the novel plasmid containing the *lnu(A)* gene (strain C5425), and the already described plasmids pLNU1 and pLNU4. Some of the differences between pLNU4 and the novel plasmid pUR5425 are shown in boxes. The amino acid changes in lincosamide nucleotidyltransferase protein between pLNU1 and pUR5425 (with a lincosamide nucleotidyltransferase similar to pLNU4) are also shown in a box.

study. This gene had been detected in *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Clostridium* spp.^{17,19,20} Regarding staphylococci, there is no information in the NCBI database about strains harboring the *lnu(B)* gene. However, according to the website <http://faculty.washington.edu/marilynr/> this gene has been already detected in the *Staphylococcus* genus. Therefore, our study describes the first report of this gene in MRSA of the lineage ST398. study. This gene had been detected in *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Clostridium* spp.^{17,19,20} Regarding staphylococci, there is no information in the NCBI database about strains harboring the *lnu(B)* gene. However, according to the website <http://faculty.washington.edu/marilynr/> this gene has been already detected in the *Staphylococcus* genus. Therefore, our study describes the first report of this gene in MRSA of the lineage ST398. In conclusion, we show that the unusual resistance phenotype L^R-M^S seems to be related to the animal clonal lineages of *S. aureus*. We describe a novel *lnu(A)*-carrying plasmid and, to the best of our knowledge, this is the first description of the *lnu(B)* gene in MRSA ST398.

Acknowledgements

Part of these data was previously presented at an international conference (Abstract 27, 2nd ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications, September 8-11, 2011; Washington) and at a national congress (Abstract 695, Fifteenth Congress of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Malaga, Spain, 2011).

Funding section

This study was financially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. Carmen Lozano has a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. Elena Gómez-Sanz has a fellowship from the Gobierno de La Rioja of Spain.

Transparency

None to declare.

References

1. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME *et al.* Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1062-6.

2. Morar M, Bhullar K, Hughes DW *et al.* Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB. *Structure* 2009; **17**: 1649-59.
3. Hauschild T, Feßler AT, Kadlec K *et al.* Detection of the novel *vga(E)* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates from cattle and poultry. *J Antimicrob Chemother* 2011; **67**: 503-4.
4. Lozano C, Aspiroz C, Rezusta A *et al.* Identification of novel *vga(A)*-carrying plasmids and Tn5406-like transposon in MRSA and *S. epidermidis* from human and animal origin. *Int J Antimicrob Agents*; in press.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-First informational supplement M100-S21*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
6. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations (*Edition de Janvier 2010*). CA-SFM, 2010. Available in: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/ca_sfm_2010.pdf.
7. Lozano C, Rezusta A, Gómez P *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* 2012; **67**: 330-4.
8. Lozano C, Aspiroz C, Ara M *et al.* 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.
9. 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.
10. Lüthje P, von Köckritz-Blickwede M, Schwarz S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 600-6.
11. Voss A, Loeffen F, Bakker J *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 1965-6.

- 12.** Neela V, Mohd Zafrul A, Mariana NS *et al.* Prevalence of ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and pig handlers in Malaysia. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 4138-40.
- 13.** Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE *et al.* Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet Microbiol* 2007; **121**: 307-15.
- 14.** Kadlec K, Pomba CF, Couto N *et al.* 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* 2010; **65**: 2692-8.
- 15.** Argudín MA, Mendoza MC, Méndez FJ *et al.* 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**: 2097-105.
- 16.** Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 936-9.
- 17.** Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS *et al.* A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 925-9.
- 18.** Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, *et al.* Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**:1145-54.
- 19.** De Azavedo JC, McGavin M, Duncan C *et al.* Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 3504-8.
- 20.** Martel A, Devriese LA, Cauwerts K *et al.* Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol* 2004; **33**: 3-7.

Supplementary data

Table S1. Primers used for PCR detection of the *lnu* genes and for the study of their genetic environments.

Primer	Temperature ^a	Primer 5' → 3'	Reference
<i>lnu</i> (A)-F	57°C	GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	1
<i>lnu</i> (A)-R		GCTTCTTTTGGAAATACATGGTATTTTCGATC	
<i>lnu</i> (A)inv-F ^b	55°C	CCAGTTAATACATCTACCCCCAGCCACC	This study
<i>lnu</i> (A)inv-R ^b		GATCGAAAAATACCATGTATTTCAAAAAGAAGC	
<i>lnu</i> (B)-F	54°C	CCTACCTATTGTTTGTGGAA	17
<i>lnu</i> (B)-R		ATAACGTTACTCTCCTATTC	
<i>lnu</i> (C)-F	58°C	ACTGTCGCAGAGCAGGAAAGCC	This study
<i>lnu</i> (C)-R		AGCATCTACACCCCAGCCACCA	
<i>lnu</i> (D)-F	58°C	ACGGAGGGATCACATGGTAAATAAAGC	This study
<i>lnu</i> (D)-R		CCTGTCTTTATCGTCCTTCCAAACCGT	
C2944-tnp-F	50°C	CCGTAGATCTGAAGAGATC	This study
2_inv-R ^c		CTCCCGCACCAGCCAGTCC	
1_inv-F ^c	58°C	GCCACAGCCGCCAGAGAACA	This study
pEF418-3-R		TCGCCCATTCAGCTGCCAGATC	
pEF418-2-F	58°C	TGGCGAGTGGCTAAGAGAGCAGT	This study
pEF418-2-R		TGCCTTTTTCCTTCACGCTCTGCA	
pEF418-1-F	56°C	AGAACCCTTCCTCCAGGCGTT	This study
pEF418-1-R		ACGGAGCTACGTCAAAACAACCAG	
pEF418-4-F	50°C	CAACTGGTTGTTTGACGTAGCTCCG	This study
IS257-R		GTAGCCGTTAGCTACTATCTAAG	

^aThese PCR reactions (except the PCR reactions marked with superscript b and c) were carried out using

BioTaqTM DNA Polymerase (Bioline) and the conditions were as follows: initial cycle of 3 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at T°C (being T the indicated temperature in the table), 1 min at 72°C, with a final step of 5 min at 72°C.

^bBioTaqTM DNA Polymerase (Bioline) was used with the following PCR conditions: initial cycle of 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 8 min at 65°C, with a final step of 8 min at 72°C.

^cTaq-Takara DNA Polymerase (TakaRa LA TaqTM, Takara Bio Inc) was used with the following conditions: 1 min at 94°C followed by 30 cycles of 5 s at 98°C, and 15 min at 68°C, with a final step of 10 min at 72°C.

Table S2. MIC values of *Staphylococcus* spp. strains included in this study, of their transformant strains, and of recipient strain *S. aureus* RN4220.

Species Methicillin resistance ^a	Strain	Lincomycin resistance gene	MIC ^b (mg/L)						
			CLI	LIN	VIR	LZD	TIA	ERY	CHL
MSSA	RN4220 ^c	-	0.25	0.5	0.125	2	0.125	0.25	4
MRSA	C1841	<i>lnu(A)</i>	0.5	>256	0.5	1	2	0.25	4
MSSA	Tf ^d -C1841	<i>lnu(A)</i>	0.25	64^e	0.125	1	0.125	0.25	4
MRSA	C5425	<i>lnu(A)</i>	0.25	128	0.25	1	0.5	0.25	4
MSSA	Tf-C5425	<i>lnu(A)</i>	0.25	64	0.125	1	0.125	0.25	4
MRSC	C2376	<i>lnu(A)</i>	2	>256	2	1	>128	0.25	4
MSSA	Tf-C2376	<i>lnu(A)</i>	0.25	64	0.125	1	0.125	0.25	4
MSSA	C2828	<i>lnu(B)</i>	8	128	2	1	>128	0.25	4
MSSA	C2829	<i>lnu(B)</i>	8	128	2	1	>128	0.25	4
MRSA	C2944	<i>lnu(B)</i>	8	128	2	1	>128	0.25	4

^aMRSA, methicillin resistant *S. aureus*; MRSC, methicillin resistant *S. sciuri*; MSSA, methicillin susceptible *S. aureus*

^bCLI, clindamycin; LIN, lincomycin; VIR, virginiamycin; LZD, linezolid; TIA, tiamulin; ERY, erythromycin; CHL, chloramphenicol.

^c*S. aureus* recipient strain used in transformation experiments for transference of the *lnu(A)* gene.

^dTf, transformant strain.

^eThe lincomycin MIC values of transformant strains appear marked in bold.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>

Identification of novel *vga(A)*-carrying plasmids and a Tn5406-like transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin

Carmen Lozano^a, Carmen Aspiroz^b, Antonio Rezusta^c, Elena Gómez-Sanz^a, Carmen Simon^d,
Paula Gómez^a, Carmelo Ortega^d, María José Revillo^c, Myriam Zarazaga^a, Carmen Torres^{a,*}

^a Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

^b Servicio Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain

^c Servicio Microbiología, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

^d Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2012

Accepted 8 June 2012

Keywords:

vga(A)

Plasmid

Tn5406

MRSA

ST398

Staphylococcus epidermidis

ABSTRACT

Nine staphylococcal strains of human and animal origin with a lincomycin-resistant/erythromycin-susceptible phenotype and carrying *vga* genes were characterised to determine the genetic elements involved in the dissemination of these uncommon resistance genes. These strains were typed by multilocus sequence typing (MLST), staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) and/or *spa* typing. Antimicrobial susceptibility was studied by disk diffusion and agar dilution methods. Presence of the genes *lnu(A)*, *lnu(B)*, *vga(A)*, *vga(A)v*, *vga(B)*, *vga(C)*, *vga(E)*, *lsa(B)* and *cfr* was studied by PCR. Transformation experiments were carried out in all strains, and the plasmid or chromosomal gene location was determined by Southern blot analysis. Genetic environments of the *vga* genes were analysed by PCR mapping or inverse PCR and sequencing. Five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 strains and three *Staphylococcus epidermidis* strains harboured the gene *vga(A)*, and one MRSA-ST8 strain contained the gene *vga(A)v*. One MRSA-ST398 strain, which also contained the gene *lnu(A)*, showed the highest minimum inhibitory concentration (MIC) to lincomycin. The *vga(A)v*-positive strain presented lower MIC values than the *vga(A)*-positive strains. Presence of the pVGA plasmid was confirmed in two MRSA-ST398 strains. Four novel *vga(A)*-carrying plasmids were detected: pUR-C2355 (in two MRSA and one methicillin-susceptible *S. epidermidis*); pUR-C4128 (one MRSA); pUR-C3036 [one methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE)]; and pUR-C3937 (one MRSE). The plasmid pUR-C4128 was very similar to pUR-C2355. Plasmids pUR-C3036 and pUR-C3937 were related and were very similar to plasmid pSE-12228-06. The gene *vga(A)v* was located in a transposon analogous to Tn5406. Therefore, four novel *vga(A)*-carrying plasmids and a variant of Tn5406 were identified in this study.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Macrolides, lincosamides and streptogramins are classified in the same group of antimicrobials based on their mechanism of action. Resistance to these antimicrobials in *Staphylococcus* spp. is mainly conferred by 23S rRNA methylases, encoded by *erm* genes, which modify the ribosomal target. This ribosomal methylation results in cross-resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins group B (MLS_B phenotype). The most common genes detected in *Staphylococcus aureus* are usually *erm(A)* [in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)] and *erm(C)* (in methicillin-susceptible *S.*

aureus) [1]. Other genes such as *erm(B)*, *erm(F)*, *erm(T)*, *erm(Y)* or *erm(TR)* have been also described in staphylococci.

Otherwise, resistance only to lincosamides and/or streptogramins is infrequent and can be due to enzymatic inactivation [*lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)*], active efflux [*vga(A)*, *vga(B)*, *vga(C)*, *vga(D)*, *vga(E)*, *lsa(A)*, *lsa(B)*, *lsa(C)*] or target site modification (*cfr*). The *lnu* genes encode lincosamide nucleotidyltransferases and produce resistance only to lincomycin and pirlimycin, although they also modify a hydroxyl group of clindamycin. Among these genes, *lnu(A)* has been described in *S. aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Lactobacillus* spp. [2,3]. This gene is usually carried by small plasmids that replicate via the rolling circle mechanism [2]. The *vga* genes encode ATP-binding cassette (ABC) transporters and were characterised as a determinant of streptogramin A resistance. However, the ability of these genes also

* Corresponding author. Tel.: +34 941 299 750; fax: +34 941 299 721.

E-mail addresses: carmen.torres@unirioja.es, carmen.torres@daa.unirioja.es (C. Torres).

to confer lincomycin and pleuromutilin resistance was later confirmed [4,5]. So far, five *vga* genes and two variant of the *vga*(A) gene [*vga*(A)_v and *vga*(A)_{LC}] have been described. The genes *vga*(A), *vga*(A)_v, *vga*(A)_{LC}, *vga*(B), *vga*(C) and *vga*(E) have been identified on plasmids or transposons in staphylococci [5], and the *vga*(D) gene was described on a plasmid in enterococci [6]. Another ABC transporter is encoded by the *lsa*(B) gene that confers low-level clindamycin resistance [7]. This gene was first identified in the plasmid pSCFS1, which also contained other lincosamide resistance genes, including *cfr* among others. The gene *cfr* encodes an rRNA methyltransferase that leads to a multiresistance phenotype (oxazolidinones, phenicols, lincosamides, pleuromutilins and streptogramin compounds) [7].

The lincosamide-resistant/macrolide-susceptible (L^R-M^S) phenotype is rarely detected in human clinical strains. However, recently this atypical phenotype has been detected in staphylococci from farm animals, healthy farmers [8] and in environmental MRSA strains from pig farms [9]. There appears to be an association between some genes responsible for this resistance profile, such as *vga*(A), *vga*(C) and *vga*(E), and the clonal complex 398 (CC398) of *S. aureus* [5,8-11].

The aim of this study was to determine the location and genetic environments of *vga* genes detected in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains of human and animal origin as well as to gain knowledge on the dissemination elements of these uncommon resistance genes.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Nine *Staphylococcus* spp. strains were included in this study, comprising six *S. aureus* (all MRSA) and three *S. epidermidis* [two methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE) and one methicillin-susceptible *S. epidermidis* (MSSE)]. These strains of human and animal origin were selected based on the presence of the unusual resistance phenotype L^R-M^S (Table 1). Three of these strains (C2931, C2362 and C2355) have been included in previous studies [8,12,13].

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility to oxacillin, cefoxitin, erythromycin, clindamycin, lincomycin, linezolid and chloramphenicol was performed by the agar disk diffusion method following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations [14]. The minimum inhibitory concentration (MIC) of erythromycin, clindamycin, lincomycin, linezolid, tiamulin, virginiamycin and chloramphenicol was determined by the agar dilution method [14]. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were used as quality control strains. CLSI breakpoints [14] were used for all antimicrobials, except for lincomycin, tiamulin and virginiamycin in which the breakpoints recommended by others were considered (<http://www.sfm.asso.fr>) [15,16].

2.3. Lincosamide, streptogramin A and/or pleuromutilin resistance genotype

Presence of the resistance genes *lnu*(A), *lnu*(B), *vga*(B), *vga*(C), *vga*(E), *lsa*(B) and *cfr* was analysed by PCR as described previously [5,8,17,18]. Detection of the genes *vga*(A) and *vga*(A)_v was performed by PCR using the primers *vga*(A)/*vga*(A)_v-F (5'-AGTGGTGGTGAAGTAACACG-3') and *vga*(A)/*vga*(A)_v-R (5'-GGTTCATACTCAATCGACTGAG-3') and the following conditions: an initial cycle of 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 56 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final cycle of 72 °C

for 5 min. All amplicons obtained were sequenced to confirm the positive results.

2.4. Molecular typing of strains

Staphylococcus aureus strains were characterised by *spa* and *agr* typing [12]. Multilocus sequence typing (MLST) was performed in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains (<http://www.mlst.net/>), and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing was performed by multiplex PCR in all methicillin-resistant strains [12]. Molecular typing of three of the strains (C2931, C2362 and C2355) was determined previously [8,12,13].

2.5. Transformation experiments

Plasmid DNA was extracted following a modification of the QIA-GEN protocol and was transformed by electroporation into the recipient strain *S. aureus* RN4220 [2]. Putative transformants were seeded on brain-heart infusion agar plates containing clindamycin (2 mg/L) [19] and the presence of *vga* genes was confirmed by PCR.

2.6. Location of the *vga*(A) and *vga*(A)_v genes

S1 pulsed-field gel electrophoresis (S1-PFGE) assay and subsequent Southern hybridisations were performed to detect the possible plasmid location of the *vga* genes [2,20]. Plugs of donor strains and of the obtained transformants were digested with 15 U of S1 nuclease (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) for 45 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 150 μL of cold stop buffer [ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 0.5 M and lauryl sarcosyl 1%]. DNA was separated using the following conditions: 6 V/cm² and 1-12 s for 12 h at 14 °C. I-CeuI-PFGE hybridisation was also used to analyse the possible chromosomal gene location. For the digestion, 10 U of I-CeuI (New England Biolabs, Ipswich, UK) were used for 4 h at 37 °C. Fragments were separated for 18 h according to the following conditions: 6 V/cm and 5-30 s for 18 h at 14 °C. PCR amplicon probes of *vga*(A)/*vga*(A)_v and 16S rDNA (in the case of I-CeuI) were utilised for hybridisation of the nylon membranes [21].

2.7. Genetic environment of the *vga*(A) and *vga*(A)_v genes

The genetic environments of the *vga*(A) and *vga*(A)_v genes were analysed by PCR mapping and sequencing based on the previously reported structures of the plasmids pVGA and pCPS32 as well as the transposon Tn5406 included in GenBank under the accession nos. FJ207465.1, FN806791.1 and AF186237.2, respectively.

The genetic environments of the remaining *vga*(A)-positive strains that could not be determined by PCR mapping were studied by inverse PCR and sequencing. Primers for amplification were *vga*(A)_{inv}-F (5'-CGTGTTACTTCACCACCACT-3') and *vga*(A)_{inv}-R (5'-GCTGAAAAGCCAACAAGGAA-3'). The PCR reaction was carried out using *Taq* DNA Polymerase (TaKaRa LA *Taq*TM; Takara Bio Inc.) with the following conditions: 1 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 5 s at 98 °C and 15 min at 68 °C, with a final step of 10 min at 72 °C.

Inverse PCR with the primers *vga*(A)_{inv}-R and circ-R (5'-CTGAACCTGTGCGTGTCTAATC-3') was performed in case of transposon detection to identify possible circularised intermediates. The obtained amplicon was sequenced to confirm the positive result.

3. Results

3.1. Molecular typing of the strains

Five MRSA strains belonged to the sequence type 398 (ST398) (four of human and one of animal origin); four of them presented

Table 1
Characteristics of nine *Staphylococcus* spp. strains included in this study with the phenotype lincosamide-resistant/macrolide-susceptible (L^R-M^S).

Strain	Species	Date of isolation	Sample origin	<i>spa</i> /MLST	SCC <i>mec</i>	<i>agr</i>	Lincomycin resistance gene	Location ^a
C2931	MRSA	January 2009	Bronchial aspirate, human	t011/ST398	V	I	<i>vga</i> (A)	pVGA, plasmid (5.7 kb)
C2362	MRSA	August 2009	Nasal, human	t108/ST398	V	I	<i>vga</i> (A)	pVGA, plasmid (5.7 kb)
C2355	MRSA	July 2009	Pleural fluid, human	t011/ST398	V	I	<i>vga</i> (A)	pUR-C2355, plasmid (7.6 kb)
C4128	MRSA	December 2010	Nasal, pig	t011/ST398	V	I	<i>vga</i> (A) + <i>lnu</i> (A)	pUR-C4128, plasmid (7.5 kb)
C5250	MRSA	March 2011	Wound, human	t011/ST398	V	I	<i>vga</i> (A)	pUR-C2355, plasmid (7.6 kb)
C3036	MRSE	April 2010	Nasal, cat	-/ST60	NT	-	<i>vga</i> (A)	pUR-C3036, plasmid (7.2 kb)
C3937	MRSE	January 2011	Nasal, human	-/ST83	IV	-	<i>vga</i> (A)	pUR-C3937, plasmid (7.1 kb)
C2665	MSSE	December 2009	Nasal, human	-/ST100	-	-	<i>vga</i> (A)	pUR-C2355, plasmid (7.6 kb)
C3898	MRSA	January 2011	Skin lesion, human	t008/ST8	IV	I	<i>vga</i> (A) <i>v</i>	Tn5406 _{like} , chromosome

MLST, multilocus sequence typing; SCC*mec*, staphylococcal cassette chromosome *mec*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSE, methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*; NT, non-typeable; MSSE, methicillin-susceptible *S. epidermidis*.

^a See Fig. 1 in which the genetic environments of the *vga* genes are shown.

the *spa* type t011 and the other showed the *spa* type t108. All MRSA-ST398 strains were typed as SCC*mec* type V and *agr* type I. The remaining MRSA strain belonged to ST8 and presented *spa* type t008, SCC*mec* type IV and *agr* type I. One MRSE strain belonged to ST60 and presented a non-typeable SCC*mec* carrying *ccrAB1* and *ccrAB3* and a class C *mec* gene complex. The other MRSE strain belonged to ST83 and showed SCC*mec* type IV. The MSSE strain was typed as ST100 (Table 1).

3.2. Detection of the *vga* genes

The five MRSA-ST398 strains and the three *S. epidermidis* strains harboured the *vga*(A) resistance gene. The variant *vga*(A)*v* was detected in the MRSA strain of ST8. No other *vga* genes were detected in these strains, but strain C4128 presented, in addition to the *vga*(A) gene, the lincomycin resistance gene *lnu*(A).

3.3. Antimicrobial susceptibility of *vga*-containing strains

The *vga*(A)-positive strains in this study showed the following MIC ranges: clindamycin, 4–8 mg/L; lincomycin, 64 mg/L to >128 mg/L; virginiamycin, 1–2 mg/L; and tiamulin, 64 mg/L to >128 mg/L (Table 2). Transformant strains were obtained for all donor strains except for C4128, C3036 and C3937. These transformant strains showed very similar MICs to their corresponding donor strains (Table 2). Otherwise, strain C3898, which harboured the gene *vga*(A)*v*, showed lower MICs for clindamycin, lincomycin and tiamulin than *vga*(A)-positive strains (Table 2).

3.4. Location and genetic environment of the *vga*(A) gene

The *vga*(A) gene was located on small plasmids that ranged in size from 5.7 kb to 7.6 kb (Table 1). Presence of the pVGA plasmid was confirmed in two MRSA strains (C2931 and C2362) by PCR mapping and sequencing. Four novel *vga*(A)-carrying plasmids (pUR-C2355, pUR-C4128, pUR-C3036 and pUR-C3937) were detected and characterised by inverse PCR and sequencing (Fig. 1). The plasmid pUR-C2355 was identified in three strains, including two MRSA (C2355 and C5250) and one MSSE (C2665). This plasmid was 7609 bp in size and contained a relaxase gene (*rlx*) and a mobilisation gene (*mobC*) that encoded mobilisation proteins of 321 and 127 amino acids, respectively. Moreover, two *rep* genes encoding Rep proteins of 154 and 288 amino acids were identified (Fig. 1). The Vga(A) protein of this plasmid showed four amino acid changes (Ser212Leu, Thr220Ala, Ser226Gly and Arg247Ser) with respect to that of the pVGA plasmid (Fig. 2). The novel plasmid pUR-C4128 was detected in one MRSA strain (C4128). It was 7567 bp in size and showed high similarity to the aforementioned novel plasmid (pUR-C2355). Both plasmids differed in the *rlx* gene size, with pUR-C4128 showing a deletion of 42 nucleotides, which translated to a

protein (Relaxase) of 307 amino acids (Fig. 1). Moreover, the Vga(A) protein of pUR-C4128 was identical to that of the pVGA plasmid (Fig. 2).

The remaining two novel *vga*(A)-carrying plasmids (pUR-C3036 and pUR-C3937) were identified in MRSE strains and presented homology between them and with plasmid pSE-12228-06 of *S. epidermidis* (AE015935.1). The plasmid pUR-C3036 was 7209 bp in size and sequence analysis revealed the presence of several mobilisation proteins (of 269, 236, 66 and 127 amino acids) and one Rep protein (of 274 amino acids). The other plasmid (pUR-C3937) was 7081 bp in size and was similar to pUR-C3036 except for an amino acid change in one mobilisation protein (Ser124Asn) and a missing fragment of 127 nucleotides in the intergenic region between *vga*(A) gene and the MobC protein. Furthermore, whilst the Vga(A) protein of pUR-C3036 showed three amino acid changes (Leu4Met, Ile36Val and Ser41Asn), the Vga(A) protein of pUR-C3937 was identical to that of the pVGA plasmid (Fig. 2).

3.5. Location and genetic environment of the *vga*(A)*v* gene

Hybridisation experiments revealed the chromosomal location of multiple copies of the *vga*(A)*v* gene in strain C3898. The genetic environment identified by PCR mapping and sequencing was very similar to Tn5406, but two amino acid exchanges in the TnpC-like protein (Phe81Ser and Glu96Lys) were detected. Moreover, circularised intermediates were identified suggesting that this transposon is functionally active.

3.6. Nucleotide sequence accession numbers

Nucleotide sequences of the novel plasmids containing the *vga*(A) gene (pUR-C2355, pUR-C4128, pUR-C3036 and pUR-C3937) as well as the Tn5406-like structure of C3898 strain have been submitted to GenBank under the accession nos. JQ312422, JQ861960, JQ312423, JQ312424 and JQ319423.

4. Discussion

The unusual resistance phenotype L^R-M^S appears to be related to animal-associated lineages of *S. aureus* since five MRSA strains belonged to ST398 in this study. MRSA-ST398, known as livestock-associated MRSA, has an important reservoir in farm animals, especially pigs. However, several studies have demonstrated colonisation and infection of humans by MRSA-ST398 [8]. In the last years, novel resistance genes such as *vga*(C), *vga*(E) and *dfrK* have been identified in strains belonging to this clonal complex [5,19,21], which acts as a reservoir of these genes. Thus, MRSA-ST398 strains harbouring the genes *vga*(A), *vga*(C) and *vga*(E) have been detected [5,9–11]. In fact, the *vga*(C) and *vga*(E) genes were first described in this clonal lineage [5,9].

Table 2
Minimum inhibitory concentrations (MICs) of *Staphylococcus* spp. strains included in this study, their transformant strains (Tf) and the recipient strain.

Strain	Lincomycin resistance gene	Plasmid or transposon	MIC (mg/L)						
			CLI	LIN	VIR	LNZ	TIA	ERY	CHL
C2931	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	2	128	0.25	4
Tf-C2931	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	1	>128	0.25	4
C2362	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	1	>128	0.25	4
Tf-C2362	<i>vga(A)</i>	pVGA	4	64	1	1	>128	0.25	4
C2355	<i>vga(A)</i>	pUR-C2355	8	64	2	2	128	0.25	8
Tf-C2355	<i>vga(A)</i>	pUR-C2355	8	64	2	1	128	0.25	8
C2665	<i>vga(A)</i>	pUR-C2355	4	64	1	1	64	0.25	8
Tf-C2665	<i>vga(A)</i>	pUR-C2355	8	64	2	1	128	0.25	8
C5250	<i>vga(A)</i>	pUR-C2355	8	64	2	2	128	0.25	8
Tf-C5250	<i>vga(A)</i>	pUR-C2355	8	64	2	1	128	0.25	8
C4128	<i>vga(A)</i> + <i>lnu(A)</i>	pUR-C4128	8	>128	2	2	128	0.25	8
C3036	<i>vga(A)</i>	pUR-C3036	4	64	2	1	64	0.25	8
C3937	<i>vga(A)</i>	pUR-C3937	8	64	2	2	128	0.25	4
C3898	<i>vga(A)v</i>	Tn5406-like	1	16	2	1	16	0.25	8
RN4220 ^a	-	-	0.25	0.5	0.125	2	0.125	0.25	4

CLI, clindamycin; LIN, lincomycin; VIR, virginiamycin; LNZ, linezolid; TIA, tiamulin; ERY, erythromycin, CHL, chloramphenicol.

^a *Staphylococcus aureus* recipient strain used in transformation experiments for transfer of the *vga(A)* gene.

The presence of these genes in livestock-associated *S. aureus* strains demonstrates the adaptation of this microorganism to antibiotic pressure given that the *vga* genes confer resistance to antimicrobials widely used in animals. Two lincosamides (lincomycin and pirlimycin) are approved for bovine subclinical mastitis treatment by intramammary infusion [22]. Moreover, *vga* genes confer resistance to pleuromutilins in addition to lincosamides and streptogramin A. The pleuromutilins are a class of antimicrobials that includes retapamulin (accepted for topical use in humans) and valnemulin and tiamulin (broadly used in veterinary medicine). Therefore, use of pleuromutilins in animals could have led to co-selection of this unusual phenotype.

The *vga(A)* gene was also detected in *S. epidermidis* strains in this study. This microorganism is mainly associated with human infections. However, it has also been detected in pets [23] or as an etiological agent of infection in horses [24].

The *vga(A)* gene has been mainly described in small mobilisable plasmids [4,9]. In this study, two MRSA-ST398 strains contained the *vga(A)* gene in the plasmid pVGA. This plasmid was described in a clinical human *S. aureus* strain [4] and is structurally closely related to pCPS32 identified in an MRSA-ST398 strain of pig origin [9]. Exchange of a *vga(A)*-carrying plasmid between humans and pigs was suggested owing to the high similarity between both plasmids [9]. Recently, transfer of another *vga(A)*-carrying plasmid of greater size (24 kb) has been also described between pigs and a farmer in the USA [10].

Interestingly, among the four novel *vga(A)*-carrying plasmids detected in this study, one of them (pUR-C2355) was identified in two staphylococci of different species that were isolated in closed environments. Whilst MRSA strain C2355 was involved in a fatal human empyema case [8], MSSE strain C2665 was obtained from a nasal sample from the patient's son. Therefore, it seems clear that this plasmid was transferred between *S. aureus* and *S. epidermidis* strains. The capacity of this plasmid to be in different bacterial hosts may be due to the presence of two different *rep* genes. In fact, one of the Rep proteins presented high similarity to others found in *S. aureus* plasmids (98%, NP_048339.1; 97%, NP_048341.1), and the other Rep protein was identical or related to others found in *Staphylococcus hominis* (100%, ZP_04060075.1) and *S. epidermidis* (88%, EFV87934.1) plasmids.

Another novel *vga(A)*-carrying plasmid was pUR-C4128, which was very similar to pUR-C2355. The pUR-C4128 plasmid was detected in one MRSA-ST398 strain in which the gene *lnu(A)* was also detected. An additive effect of the *lnu(A)* gene [encoding

lincosamide nucleotidyltransferase that mediates inactivation of lincosamides] and the *vga(A)* gene [encoding an ABC transporter that causes active efflux of lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins] might explain the high MIC to lincomycin detected. A similar effect has been previously described in strains harbouring the *vga(A)_{LC}* gene and the *lnu(A)* or *erm(C)* genes [25].

The two novel plasmids detected in MRSE strains (pUR-C3036 and pUR-C3937) showed high similarity and presented identical Rep and several identical Mob proteins to pSE-12228-06. The plasmid pSE-12228-06 was also identified in an *S. epidermidis* strain [26]. In these terms, these plasmids could have a narrow host range, having preference for this microorganism. The plasmid pSE-12228-06 contained the *tagG* gene, encoding a teichoic acid translocation permease protein. This gene and another gene encoding a hypothetical protein were missing in the plasmids in this study. Instead, the gene *vga(A)* was present in both novel plasmids (between a hypothetical protein and the MobC protein). A similar finding was detected in the pACK4 plasmid, which is virtually identical to plasmid pVGA but without the *vga(A)* gene [27]. A common origin for these plasmids is suspected and could explain these structural similarities.

In addition, in two of the novel *vga(A)*-carrying plasmids (pUR-C4128 and pUR-C3937), the Vga protein was identical to that of pVGA. However, a few variations with respect to the Vga protein of pVGA were detected in the other two novel plasmids (pUR-C2355 and pUR-C3036). Some amino acid changes in this protein have been previously described in other *vga(A)*-carrying plasmids [10].

Otherwise, the *vga(A)v* gene was identified in a MRSA-ST8 strain of human origin in this study. MRSA-ST8 is a community-acquired MRSA strain that was first widespread in the USA (USA300 clone), but it has also been found in Europe [28]. This clonal lineage is associated with a human origin although an adaptation capacity of MRSA-ST8 for equine colonisation has been suggested [29]. A variant of Tn5406 was identified in this MRSA-ST8 strain with two amino acid exchanges in the TnpC-like protein. This transposon had been previously described in a clinical strain of *S. aureus* and is very similar to Tn554, which contains the *erm(A)* gene [30]. Similar to Tn554 and other transposons detected in staphylococci (Tn558, Tn559 and Tn6133), Tn5406 integrates preferentially into the chromosomal *radC* gene. The *vga(A)v* gene contained in this Tn5406-like conferred lower levels of resistance to clindamycin, lincomycin and tiamulin than the *vga(A)* gene. This is in accordance with the MICs detected by others [4]. It is believed that the presence of multiple copies of *vga(A)v* affects the resistance level conferred

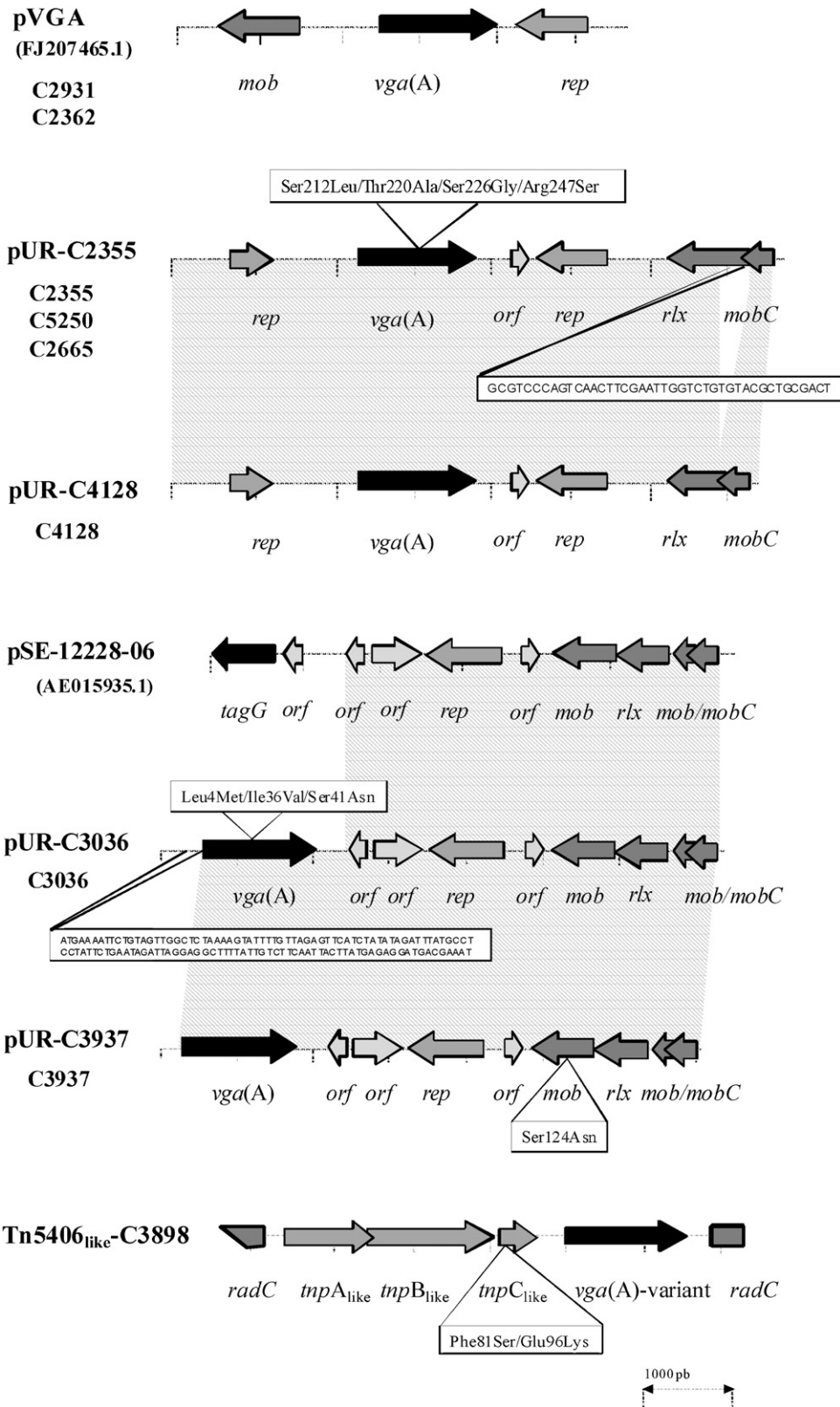


Fig. 1. Structure of the genetic environment of novel plasmids containing the *vga(A)* gene (strains C2355, C4128, C3036 and C3937), the plasmids already described (pVGA and pSE-12228-06) and the Tn5406-like structure of strain C3898. The differences between pUR-C2355 and pUR-C4128, between pUR-C3036 and pUR-C3937, and between Tn5406 and Tn5406-like are shown in boxes.

to the strain [4]. In MRSA strain C3898, multiple copies of this gene were detected in the chromosome. However, although some transposons of the Tn554 family have been detected on plasmids [31], no positive results were obtained in S1-PFGE hybridisation.

In conclusion, plasmids and transposons play an important role in the dissemination of *vga* genes in staphylococci. Plasmids with more than one *rep* gene (pUR-C2355 and pUR-C4128) have been detected in this study. Moreover, rearrangements in plasmids,

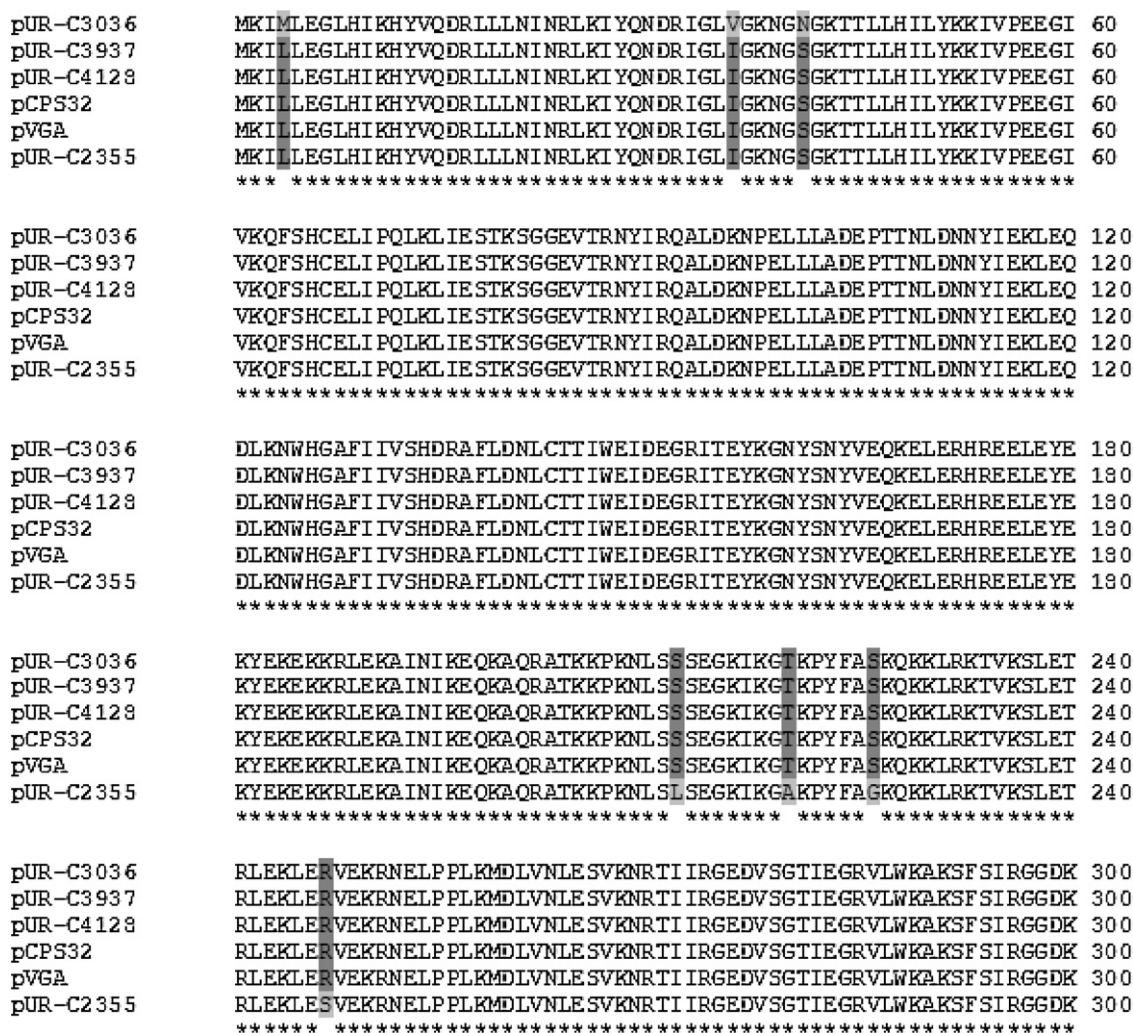


Fig. 2. Amino acid sequence alignment of part of the Vga(A) protein of pVGA, pCPS32, pUR-C2355, pUR-C4128, pUR-C3036 and pUR-C3937. Amino acid changes are shown in grey.

such as the loss of some genes and the presence of others (pUR-C3036/pUR-C3937 versus pSE-12228-06) or several insertions or mutations (pUR-C2355 versus pUR-C4128; pUR-C3036 versus pUR-C3937), have been identified in the novel plasmids described. These facts allow the formation of novel resistance plasmids or transposons. Four novel plasmids, which carried the gene *vga(A)* as their sole resistance gene, were identified in this study. So far, this gene appears to be carried by small mobilisable plasmids. Moreover, a variant of Tn5406 was also detected. These findings are especially worrisome since the *vga* genes confer resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins and their presence in mobile genetic elements may have important clinical implications.

Acknowledgments

Part of these data has been previously presented at an international conference [2nd American Society for Microbiology-European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ASM-ESCMID) Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications, 8-11 September 2011, Washington, DC] and at a national congress (Fifteenth Congress of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 15-18 June, Malaga, Spain).

Funding: This work was partially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. CL has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. EG-S has a fellowship from the Gobierno de La Rioja of Spain. PG has a Colabora contract (2010/08) from the Gobierno de La Rioja of Spain. AR belongs to the Grupo Consolidado de Investigación B-65 of the Gobierno de Aragón of Spain.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:891-4.
- Lüthje P, von Köckritz-Blickwede M, Schwarz S. Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene *lnu(A)*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:600-6.
- Zhai Z, Hao Y, Yin S, Luan C, Zhang L, Zhao L, et al. Characterization of a novel rolling-circle replication plasmid pYS18 from *Lactobacillus sakei* YS18. *Plasmid* 2009;62:30-4.
- Gentry DR, McCloskey L, Gwynn MN, Rittenhouse SF, Scangarella N, Shawar R, et al. Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4507-9.
- Schwendener S, Perreten V. New transposon Tn6133 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 contains *vga(E)*, a novel streptogramin A,

- pleuromutilin, and lincosamide resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4900-4.
- [6] Jung YH, Shin ES, Kim O, Yoo JS, Lee KM, Yoo JI, et al. Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatH*, conferring resistance to streptogramin A in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4744-9.
- [7] Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:936-9.
- [8] Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011;17:138-40.
- [9] 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* 2010;65:2692-8.
- [10] 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;71:177-80.
- [11] Hauschild T, Feßler AT, Kadlec K, Billerbeck C, Schwarz S. Detection of the novel *vga(E)* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates from cattle and poultry. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:503-4.
- [12] Lozano C, Rezusta A, Gómez P, Gómez-Sanz E, Báez N, Martín-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* 2012;67:330-4.
- [13] Aspiroz C, Lozano C, Gilaberte Y, Zarazaga M, Aldea MJ, Torres C. Molecular characterisation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains ST398 in patients with skin infections and their relatives. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:18-21 [in Spanish].
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- [15] Jones RN, Pfaller MA, Rhomberg PR, Walter DH. Tiamulin activity against fastidious and nonfastidious veterinary and human bacterial isolates: initial development of in vitro susceptibility test methods. *J Clin Microbiol* 2002;40:461-5.
- [16] Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet Microbiol* 2003;95:133-47.
- [17] 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;168:145-51.
- [18] Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, et al. 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;7:1269-77.
- [19] 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* 2009;53:3589-91.
- [20] Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 1995;226:235-40.
- [21] López M, Kadlec K, Schwarz S, Torres C. First detection of the staphylococcal trimethoprim resistance gene *dfiK* and the *dfiK*-carrying transposon Tn559 in enterococci. *Microb Drug Resist* 2012;18:13-8.
- [22] Lüthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *Antimicrob Chemother* 2006;57:966-9.
- [23] 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;58:428-31.
- [24] Trostle SS, Peavey CL, King DS, Hartmann FA. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infection following repair of an ulnar fracture and humeroradial joint luxation in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:554-9.
- [25] Novotna G, Janata J. A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, *Vga(A)_{1C}*, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate specificity towards lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4070-6.
- [26] Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* 2003;49:1577-93.
- [27] Gargis AS, Heath LS, Heath HE, LeBlanc PA, Sloan GL. Characterization of pACK4, a mobilizable plasmid from *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Plasmid* 2009;62:201-5.
- [28] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008;8:747-63.
- [29] Cuny C, Friedrich A, Kozyska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol* 2010;300:109-17.
- [30] Haroche J, Allignet J, El Solh N. Tn5406, a new staphylococcal transposon conferring resistance to streptogramin and related compounds including dalfofpristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2337-43.
- [31] Kehrenberg C, Schwarz S. Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:813-5.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection ^{☆,☆☆}

Carmen Lozano ^a, Montserrat Ruiz-García ^b, Elena Gómez-Sanz ^a, Pilar López-García ^b, Gloria Royo-García ^b, Myriam Zarazaga ^a, Carmen Torres ^{a,*}

^a Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain

^b Sección de Microbiología, Hospital General Universitario de Elche, 03203 Elche, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2012

Accepted 28 April 2012

Available online xxx

Keywords:

cfr

MRSE

ST22

fexA

Linezolid resistance

ABSTRACT

The *cfr* gene was identified in 3 methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) isolates of lineage ST22 implicated in a fatal human infection. MRSE isolates displayed an indistinguishable pulsed-field gel electrophoresis profile and SCCmec type III, and showed a multiresistance phenotype. The presence of *cfr*, *fexA*, *aac(6′)-aph(2′)*, and *dfrS1* genes was confirmed by polymerase chain reaction and sequencing. A mutation in 23S rRNA gene (C2534T) and amino acid changes and/or insertions in L3 and L4 proteins were detected. The *cfr* and *fexA* genes were located in a conjugative plasmid of approximately 45 kb and in the chromosome.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Linezolid is the first oxazolidinone agent used for the treatment of Gram-positive pathogens. Resistance to this antimicrobial has rarely appeared since its introduction in 2000, being more common in coagulase-negative staphylococci and enterococci (Gómez-Gil et al., 2009; Meka et al., 2004). This resistance is usually due to mutations in the 23S rRNA target (Meka et al., 2004) or in the ribosomal proteins L3, L4, and L22 (Mendes et al., 2010). Recently, a new mechanism mediated by the *cfr* gene has been reported (Kehrenberg et al., 2005). This gene encodes a methyltransferase which produces the methylation of the 23S rRNA at position A2503 (*Escherichia coli* 23S rRNA gene numbering) leading to a multiresistance phenotype (oxazolidinones, phenicols, lincosamides, pleuromutilins, and streptogramin compounds) (Long et al., 2006). So far, the *cfr* gene has been detected in staphylococci from humans and animals in the USA, Europe, and South America (Kehrenberg and Schwarz, 2006; Mendes et al., 2008; Morales et al., 2010; Toh et al., 2007).

In this study, the *cfr* gene has been identified in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) isolates implicated in a

life-threatening human infection. The aim was to characterize these MRSE isolates and to determine the location and the genetic environment of the *cfr* gene.

A 27-year-old female was admitted with unspecific gastrointestinal symptoms in a Spanish hospital and was initially diagnosed with pancreatitis. The patient's conditions worsened with impaired renal function, respiratory distress, fever, leukocytosis, and left intraparenchymal cranial hematoma that required surgical decompressive craniotomy. The patient was treated with multiple antibiotics (beta-lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, or cotrimoxazole, among others) including 5 cycles of linezolid, and she died after 10 months in the hospital due to generalized polymicrobial infection and multi-system failure.

Linezolid-resistant MRSE isolates were detected in pure culture in cerebrospinal-fluid, pleural-drainage, blood-culture, and vascular-catheter samples, and recovery was coincident with linezolid treatment. Identification and antibiotic susceptibility testing was performed by the Wider system (Soria Melguizo), and species determination was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) (Park et al., 2008). Three MRSE isolates (C2826, C2825, and C2827: from cerebrospinal fluid, pleural drainage, and vascular catheter samples, respectively) were further characterized (the isolate from blood culture was lost). They were typed by multilocus sequence typing (<http://sepidermidis.mlst.net>), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and SCCmec typing (Lozano et al., 2011a; Murchan et al., 2003). In addition, linezolid, chloramphenicol, lincomycin, clindamycin, erythromycin, tiamulin, virginiamycin, tetracycline, and trimethoprim susceptibility was studied by the agar dilution method (CLSI,

[☆] Transparency declarations: This work was partially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. Carmen Lozano has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain. Elena Gómez-Sanz has a fellowship from the Gobierno de La Rioja. There are no conflicts of interest.

^{☆☆} The data of this study were presented at the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases held in London, United Kingdom, 31 March–3 April 2012.

* Corresponding author. Tel.: +34-941-299750; fax: +34-941-299721.

E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).

Table 1
MIC values for different antimicrobials and resistance mechanisms of the 3 MRSE strains, *S. aureus* recipient strain ATCC 29213, and transconjugant strain.

Isolate	MIC (mg/L) ^a								Resistance genes	Mutation (23S rRNA)	Amino acid changes ^b		
	LZ	CLO	CLI	LIN	ERY	TIA	VIR	TET			TMP	L3	L4
C2826 ^c	64	>256	>256	>256	1	>128	32	0.125	64	<i>cfr</i> , <i>fexA</i> , <i>aac(6′)-aph(2′)</i> , <i>dfrS1</i>	C2534T	Ala58Thr, Leu101Val, 135GlnGlyArgGlyProMet136I	Asn64Lys, Asn158Ser, 71Gly72I
ATCC 29213	2	4	0.25	0.5	0.25	0.125	0.125	0.25	2				
TC-2826 ^d	16	128	>256	>256	0.25	>128	32	0.25	2	<i>cfr</i> , <i>fexA</i>			

^a LZ = Linezolid; CLO = chloramphenicol; CLI = clindamycin; LIN = lincomycin; ERY = erythromycin; TIA = tiamulin; VIR = virginiamycin; TET = tetracycline; TMP = trimethoprim.

^b I = Insertion.

^c The MIC values of isolates C2825 and C2827 were similar to those of C2826.

^d Transconjugant of strain C2826.

2011). The presence of the resistance genes *mecA*, *cfr*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lnu(C)*, *lnu(D)*, *vga(A)*, *vga(B)*, *vga(C)*, *lsa(B)*, *fexA*, *aac(6′)-aph(2′)*, *ant(4′)-Ia*, *aph(3′)-IIIa*, *fusB*, *fusC*, *dfrS1*, *dfrD*, *dfrG*, and *dfrK* was studied by PCR (Kehrenberg and Schwarz, 2006; Lozano et al., 2011a, b; McLaws et al., 2008). Mutations in 23S rRNA and *fusA* genes were determined by PCR and sequencing (McLaws et al., 2008; Mendes et al., 2010). Amino acid changes in L3, L4, L22, GrlA, and GyrA proteins were also studied (Mendes et al., 2010; Yamada et al., 2008). Genes encoding virulence factors or involved in biofilm production (*lukF/lukS-PV*, *icaA*, *icaB*, and *icaC*) were studied by PCR (Lozano et al., 2011b; Ziebuhr et al., 1999). Conjugative transfer of the *cfr* gene was performed by filter mating (Shore et al., 2010) using MRSE C2826 as donor strain and a rifampicin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 as recipient. Plasmid or chromosomal gene location was determined by S1 and *I-CeuI*-PFGE hybridizations with *cfr*, *fexA*, and 16S rDNA probes (Kehrenberg and Schwarz, 2006). Genetic environment of the *cfr* gene was studied by PCR mapping and subsequent sequencing.

The 3 MRSE isolates recovered from the patient displayed an indistinguishable PFGE profile, belonged to sequence type ST22, and contained SCCmec type III. In addition to beta-lactam resistance (with

a MIC value to oxacillin >4 mg/L), all of them showed resistance to oxazolidinones, phenicols, lincosamides, pleuromutilins, streptogramins, aminoglycosides, fluoroquinolones, cotrimoxazole, and fusidic acid (Table 1). The presence of *cfr*, *fexA*, *aac(6′)-aph(2′)*, and *dfrS1* genes was confirmed by PCR and sequencing. Mutations mediating quinolone resistance revealed Ser80Phe and Asp84Asn exchanges in GrlA protein and Ser84Phe in GyrA protein. MRSE isolates presented Ala58Thr and Leu101Val amino acid changes and 135GlnGlyArgGlyProMet136 insertion in L3 ribosomal protein. Asn64Lys and Asn158Ser substitutions and 71Gly72 insertion were detected in L4 riboprotein. The sequencing analysis of domain V of 23S rRNA revealed that the 3 isolates presented the C2534T mutation (*E. coli* numbering) instead of the most commonly found mutation G2576T in staphylococci. No mutations were identified in the protein L22 or in the gene *fusA*.

S1-PFGE hybridization revealed a plasmid location of the *cfr* and *fexA* genes in strain C2826. This plasmid was transferred by conjugation (transfer frequency: 1.2×10^{-8} transconjugants/recipients). S1-PFGE hybridization of the transconjugant strain showed that the *cfr* and *fexA* genes were in a plasmid of the same size (approximately 45 kb) as the donor strain (C2826) (Fig. 1). Genetic environment of the *cfr* gene was studied by PCR mapping and subsequent sequencing based on a previously reported structure (GenBank FR675942.1) (Table 2). The structure of pSCFS7 (GenBank FR675942.1) was used to design primers due to the fact that the plasmid size detected and the presence of the genes *cfr* and *fexA* made suspect the existence of this plasmid (Table 2). Amplicon sequencing showed that the genetic environment of the *cfr* gene was identical in both strains and it was similar to pSCFS7 (Fig. 2) (Shore et al., 2010). Additionally, *I-CeuI*-PFGE hybridization with *cfr*, *fexA*, and 16S rDNA probes also showed the chromosomal location of the *cfr* and *fexA* genes in strain C2826 (Fig. 1).

All 3 MRSE strains were negative by PCR for the Pantone–Valentine leukocidin, although they gave a positive reaction for the *icaA*, *icaB*, and *icaC* genes.

Table 2

Primers designed in this study to be used in PCR reactions to gain insight into the genetic environment of the *cfr* gene.

Primer designation	Sequence (5′→3′)	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
pSCFS7-1-f (1)	GGAACAGTGATAAGCCGGATGAT	54	647
pSCFS7-1-r (3)	GAAGGTGTATCCTTCCAGTCATATC		
pSCFS7-2-f (2)	GTACTGTAAGTGGACGAATATCTAC	54	1362
pSCFS7-2-r (4)	TGACTCCCAACCTGCTTTATACTTCA		
pSCFS7-3-f (5)	GCTGCTTGTGGTCAATTATATGGT	56	2965
pSCFS7-3-r (8)	GACGCTATGCTACTACTCAGATGCC		
pSCFS7-seq-f ^a (6)	CTGCAATTTCTCTCAAACAG		Only for sequencing
pSCFS7-seq-r ^a (7)	ATTAATACGTCCTCTGAACG		Only for sequencing

^a The 2 sequencing primers were used for the 2965-bp fragment.

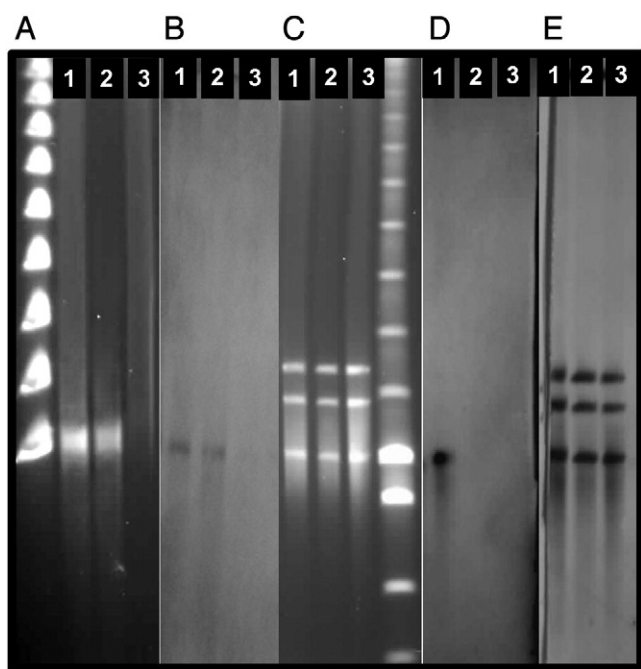


Fig. 1. The numbers (1–3) are the following strains: 1) strain C2826; 2) transconjugant of C2826; and 3) *S. aureus* recipient strain ATCC 29213. A) S1-PFGE; B) S1-PFGE hybridization with *cfr* probe; C) *I-CeuI*-PFGE; D) *I-CeuI*-PFGE hybridization with *fexA* probe; and E) *I-CeuI*-PFGE hybridization with 16S rDNA probe.

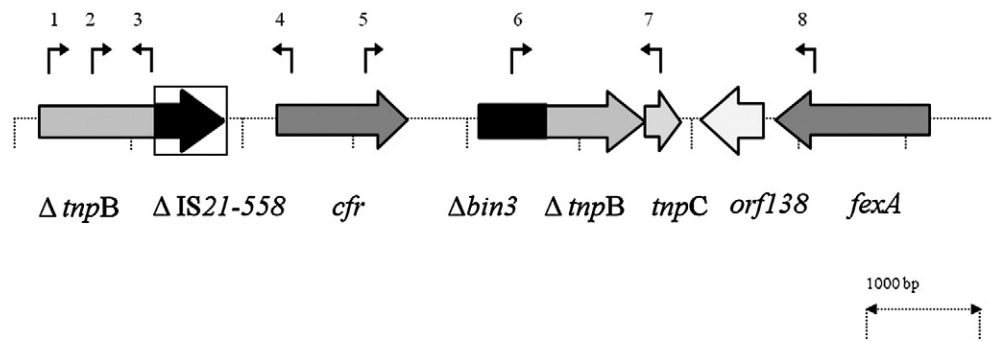


Fig. 2. Genetic environment of the gene *cfr* detected in the MRSE strain C2826 and in the transconjugant strain. The structure sequenced was similar to the one previously found in plasmid pSCFS7 (FR675942.1). The position and orientation of the genes are indicated by arrows. The amplification and sequencing primers are indicated by small arrows, and their sequences are shown in Table 2: 1: pSCFS7-1-f; 2: pSCFS7-2-f; 3: pSCFS7-1-r; 4: pSCFS7-2-r; 5: pSCFS7-3-f; 6: pSCFS7-seq-f; 7: pSCFS7-seq-r; 8: pSCFS7-3-r.

Since the first description of *cfr*-mediated linezolid resistance in a *S. epidermidis* isolate from human origin (Mendes et al., 2008), few similar cases have been reported (Bongiorno et al., 2010; Farrell et al., 2011; Mendes et al., 2010). In 2 of them in which strains were typed, the *cfr*-positive isolates belonged to ST2 and/or ST23 lineages (Kehrenberg et al., 2007; Mendes et al., 2010), instead of the ST22 lineage found among our strains. It is important to remark the presence of the gene *cfr* in both plasmid and chromosomal location in our strains. Although a chromosomal location has been previously reported (Kehrenberg et al., 2007; Toh et al., 2007), this gene is usually plasmid mediated. In fact, other studies have suggested that the chromosomal flanking regions of the *cfr* gene have a plasmid origin (Toh et al., 2007). Interestingly, different *cfr*-carrying plasmids containing other resistance genes such as *fexA* or *lsa(B)* and, more recently, *tet(L)*, *ant(4')-Ia*, and *dfrK* genes have been described (Kehrenberg et al., 2007; Ruiz de Gopegui et al., 2012; Shore et al., 2010). Otherwise, our strains also showed mutations in 23S rRNA gene and in L3 and L4 riboproteins which contribute to linezolid resistance. Surely, the main linezolid resistance mechanism in our strains is the gene *cfr* since high MIC value to this antibiotic was obtained in a transconjugant strain. The mutation C2534 (in 23S rRNA) detected in this study has been previously found by others and it seems to confer MIC values ranging from 8 to 10 mg/L (Liakopoulos et al., 2010). Moreover, modifications in L3 and L4 riboproteins have been related with linezolid resistance, but the level that they confer is usually very low (Mendes et al., 2010). Moreover, the presence of the gene *fexA* in the same plasmid that carries the gene *cfr* might have an additive effect on phenicol resistance (Kehrenberg and Schwarz, 2006).

In summary, we describe a fatal human case in which *cfr*-positive MRSE ST22 strains were implicated. The spread of this resistance mechanism is especially worrisome owing to the implication of this gene in simultaneous resistance for several antimicrobials.

References

- Bongiorno D, Campanile F, Mongelli G, Baldi MT, Provenzani R, Reali S, et al. DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2336–40.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement (M100-S21). Wayne, PA: CLSI; 2011.
- Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. LEADER Program results for 2009: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6,414 clinical isolates from 56 medical centers in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3684–90.
- Gómez-Gil R, Romero-Gómez MP, García-Arias A, Ubeda MG, Busselo MS, Cisterna R, et al. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65:175–9.
- Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:483–7.
- Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1156–63.
- 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;57:1064–73.
- Liakopoulos A, Spiliopoulou I, Damani A, Kanellopoulou M, Schoina S, Papafragas E, et al. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1070–1.
- Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2500–5.
- 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* 2011a;17:923–7.
- Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011b;17:138–40.
- McLaws F, Chopra I, O'Neill AJ. High prevalence of resistance to fusidic acid in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1040–3.
- Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami PC, et al. 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;190:311–7.
- Mendes RE, Deshpande LM, Castanheira M, DiPersio J, Saubolle MA, Jones RN. First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2244–6.
- 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;65:2329–35.
- Morales G, Picazo JJ, Baos E, Candel FJ, Arribi A, Peláez B, et al. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2010;50:821–5.
- Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, 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.
- Park HK, Woo SY, Jung YJ, Lee EO, Cha JE, Park HS, et al. Detection of virulence genes of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from suprapubic urine from infants with fever. *J Bacteriol Virol* 2008;38:189–96.
- Ruiz de Gopegui E, 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;56:2139–42.
- Shore AC, Brennan OM, Ehrlich R, Monecke S, Schwarz S, Slickers P, et al. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfr* in a Pantone–Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4978–84.
- Toh SM, Xiong L, Arias CA, Villegas MV, Lolans K, Quinn J, et al. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol* 2007;64:1506–14.
- Yamada M, Yoshida J, Hatou S, Yoshida T, Minagawa Y. Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. *Br J Ophthalmol* 2008;92:848–51.
- 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 adhesion synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999;32:345–56.

Expansion of a Plasmid Classification System for Gram-Positive Bacteria and Determination of the Diversity of Plasmids in *Staphylococcus aureus* Isolates of Human, Animal, and Food Origins

AQ: au Carmen Lozano,^a Lourdes García-Migura,^{b,c} Carmen Aspiroz,^d Myriam Zarazaga,^a Carmen Torres,^a and Frank Møller Aarestrup^e

Area Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain^a; Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^b; Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain^c; Servicio Microbiología, Hospital Royo Villanova, Zaragoza, Spain^d; and National Food Institute, DTU, Lyngby, Denmark^e

AQ: A **An expansion of a previously described plasmid classification was performed and used to reveal the plasmid content of a collection of 92 *Staphylococcus aureus* strains of different origins. *rep* genes of other genera were detected in *Staphylococcus*. S1 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) hybridizations were performed with 18 representative *S. aureus* strains, and a high number of plasmids of different sizes and organizations were detected.**

AQ: B **P**lasmids are important for the epidemiology and evolution of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* (18). However, to study their distribution and relationship to the host cells, a classification system is essential (4), and a number of classification systems have been established. Novick et al. (17) divided plasmids into three classes: (i) small rolling-circle, (ii) multiresistance, and (iii) conjugative. Since then, a fourth class (pSK639 family) has been proposed (3). Another system, based on incompatibility groups, identified 15 groups within the *Staphylococcus* genus (22). Moreover, a classification system that uses restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns was suggested for large plasmids (21). Recently, plasmid classification based on PCR amplification of conserved areas of the replication initiating genes (*rep*) from 103 plasmids belonging to different Gram-positive bacteria was described (11).

The aim of this study was to expand the previous classification system (11) and to implement it with a collection of *S. aureus* strains of different origins.

T1/AQ:C All *S. aureus* plasmid sequences published in the GenBank database until November 2010 were retrieved, and only one plasmid per *rep* gene was included (Table 1). They comprised 112 sequences from 108 *S. aureus* plasmids (81 not defined in the previous system). The BioNumerics software program (Applied Maths, Belgium) was used to generate nucleotide- and amino acid-based phylogenetic trees by neighbor-joining analysis (see Fig. S1 in the supplemental material), and a cutoff value of 75% identity was chosen. Considering both trees, a total of 15 *rep* families (6 newly defined plus 9 from the previous study [11]) and 10 unique sequences (USs) were defined. The six newly defined *rep* families were *rep*_{7b}, *rep*₂₀, *rep*₂₁, *rep*₂₂, *rep*₂₃, and *rep*₂₄. Primers were designed for these 6 new *rep* families, as well as for the 10 USs and for *rep*₅ (Table 2).

T2 The expanded system was tested with 92 strains from Spain and Denmark: 70 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains and 22 methicillin-susceptible (MSSA) strains from different origins (human, animal, and food) (see Table S1 in the supplemental material). Based on their antimicrobial susceptibility profiles, 18 resistance genes were tested for the strains of the Spanish collection (8, 15). Multiplex PCRs from the previous study (11), in addition to the new simplex PCRs, were performed for the 92 strains (Table 2), and all obtained amplicons from 18 selected

strains were sequenced (corresponding to all *rep* families detected for the Spanish collection). These 18 representative strains were submitted to S1 pulsed-field gel electrophoresis (S1-PFGE) nuclease digestion to assess the number and size of plasmids from each of them (1). S1-PFGE and gel DNA plasmid extraction (for small plasmids) hybridizations were performed to determine the sizes of the plasmids in which the different *rep* genes were located. In cases where results were not obtained in S1-PFGE hybridization, I-CeuI PFGE hybridization with *rep* genes and 16S rRNA genes was performed to detect the possible chromosomal *rep* gene location.

Among the 92 *S. aureus* strains, 14 *rep* families and 2 USs were detected (Table 3). Up to 5 *rep* families were found in some strains, and 9 strains (8.7%) could not be classified in any of the *rep* families or USs established (see Table S1 in the supplemental material). The most predominant *rep* families were *rep*₇ ($n = 46$), *rep*₁₀ ($n = 35$), *rep*₂₁ ($n = 32$), and *rep*₂₂ ($n = 28$). The *rep* families detected according to their origins and clonal complexes are shown in Table 3.

T4/AQ:E A high number of plasmids (from three to eight) were detected among the 18 strains examined by S1-PFGE. These plasmids differed in sizes from 500 to 2.5 kb (Table 4). The plasmid sizes varied depending on *rep* family. In the *rep* families *rep*₅, *rep*₇, *rep*₂₀, and *rep*₂₂, plasmid sizes were different from those of the plasmids in which the *rep* genes were originally detected. In some cases, two *rep* genes hybridized with the same plasmid size. There are two plausible explanations for this: the strain contained two plasmids of the same size, or both *rep* genes were located in the same plasmid. Mosaic plasmids have previously been detected (5). All *rep*₁₀-positive strains harbored a *rep* gene identical to that of pDLK1, and a similar size was revealed by hybridization (13). Similar results were obtained for *rep*₂₁, which in all cases hybridized to small

Received 16 March 2012 Accepted 4 June 2012

Published ahead of print 8 June 2012

Address correspondence to Carmen Torres, carmen.torres@unirioja.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00870-12

TABLE 1 Description of all 112 *rep* sequences from *S. aureus* used in this study^a

Gene/ORF	Plasmid (size [kb])	GenBank accession no.	Position of <i>rep</i> gene	<i>rep</i> gene size (bp)	Rep family ^b
<i>repE</i>	pIP680 (11.3)	AF117258.1	1–456	456	1
<i>CDS2</i>	pSAS (20.6)	BX571858	2,527–3,387	861	5
<i>repB</i>	pWBG752 (24.7)	GQ900394	5,046–5,906	861	5
<i>rep</i>	SAP047A (29)	GQ900405.1	960–1,820	861	5
<i>rep</i>	pMW2 (20.7)	NC_005011	17,577–18,437	861	5
<i>rep</i>	pN315 (24.7)	AP003139	232–1,215	984	5
<i>rep</i>	pRJ6 (7.9)	AF241888.2	6,396–7,325	930	5
<i>rep</i>	pRJ9 (10.4)	AF447813.1	2,808–3,665	858	5
<i>Rep</i>	pJE1 (50)	AF051916.1	798–1,433	636	5
<i>repC</i>	Cassette	AB037671	30,750–29,806	945	7
<i>repC</i>	pSTE2 (6.9)	AJ888003	2,599–1,655	942	7
ORF	pT181 (4.4)	NC_001393	4,289–4,439, 1–794	942	7
ORF	pKH1 (24.8)	SAU38656	3,769–4,338	570	7
<i>rep</i>	pUSA02 (4.4)	NC_007791.1	3,369–4,313	945	7
<i>rep</i>	J3358 (6)	NC_001763.1	826–1,770	945	7
<i>repC</i>	pKH16 (4.4)	NC_010262.1	3,657–4,442, 1–159	945	7
<i>repC</i>	pKH17 (4.4)	NC_010284.1	3,656–4,441, 1–159	945	7
<i>repD</i>	pTZ4 (4.6)	NC_010111.1	1,213–2,133	921	7
<i>rep</i>	SAP060B (4.5)	GQ900417.1	627–1,571	945	7
<i>rep</i>	pSBK203 (3.8)	U35036.1	88–1,032	945	7
<i>repC</i>	pS0385-1 (5.2)	AM990993.1	819–1,568	750	7
<i>rep</i>	SAP094A (4.4)	GQ900443.1	4,297–4,439, 1–802	945	7
<i>repD</i>	pC221 (4.6)	X02529.1	1,202–2,137	936	7
<i>rep</i>	pUB112 (4)	M21929.1	189–1,130	942	7
<i>rep</i>	pKH7 (4.1)	U38429.1	87–1,019	933	7
<i>repC</i>	pKH6 (4.4)	U38428.1	3,654–4,439, 1–159	945	7
<i>repE</i>	pS194 (4.4)	X06627.1	3,371–4,315	945	7
<i>rep</i>	pS0385-2 (4.4)	AM990994.1	3,626–4,381, 1–177	933	7
<i>rep</i>	MSSA476	BX571857.1	138,752–139,572	821	7
<i>CDS3</i>	pUSA02 (4.4)	CP000257	3,369–4,313	945	7
<i>repJ</i>	pC223 (4.6)	NC_005243.1	4,528–4,608, 1–864	945	7b
<i>rep</i>	pVGA (5.7)	NC_011605.1	794–1,732	939	7b
<i>repA</i>	SAP089A (4.6)	GQ900440.1	2,642–1,763	880	7b
<i>repL</i>	pDLK1 (2.4)	GU562624.1	28–504	477	10
<i>rep</i>	SAP093B (1.3)	GQ900442.1	89–565	477	10
ORF	pSN2 (1.3)	NC_001392	588–1,064	477	10
<i>repL</i>	pWBG738 (2.5)	DQ088624.1	1–477	477	10
<i>rep</i>	pSK6 (1.6)	U96610.1	770–1,234	465	10b
<i>rep</i>	SAP104B (1.6)	GQ900451.2	631–1,095	465	10b
<i>rep</i>	pSK77 (27.7)	GQ900494.1	26,776–27,240	465	10b
<i>rep</i>	pSK3 (1.7)	U96609.1	876–1,340	465	10b
<i>rep</i>	pSK17 (36.4)	GQ900513.1	9,392–9,856	465	10b
<i>orf154</i>	pOX2000 (1.6)	X55798.1	587–1,051	465	10b
<i>rep</i>	pC194 (2.9)	NC_002013	117–812	696	13
<i>rep</i>	pKH13 (2.9)	NC_010426.1	341–1,186	846	13
<i>rep</i>	pMC524/MBMc (2.9)	AJ312056.2	2,141–2,818	678	13
<i>rep</i>	pSK89 (2.4)	M37889	1,149–226	924	13
<i>rep</i>	pWBG1773 (2.9)	EF537646	736–1,659	924	13
<i>repA</i>	pUSA03 (37.1)	NC_007792.1	101–1,060	960	15
<i>repA</i>	pLW043 (57.9)	AE017171	6,349–7,524	1176	15
<i>rep</i>	pSK41 (46.4)	AF051917	13,205–14,164	960	15
<i>rep</i>	pSAS (20.7)	NC_005951.1	4,678–5,421	744	16
<i>CDS6</i>	pSJH101 (30.4)	CP000737	4,569–5,552	984	16
<i>CDS21</i>	pSJH901 (30.4)	CP000704	20,787–21,530	744	16
<i>rep</i>	pSaa6159 (20.7)	CP002115.1	19,682–20,425	744	16
Unknown	SAP056A (27.1)	GQ900478.1	22,022–21,279	744	16
<i>rep</i>	SAP052A (32.4)	GQ900412.1	23,379–22,636	744	16
Unknown	pWBG759 (28.4)	GQ900401.1	16,047–15,304	744	16
Unknown	SAP019A (27.4)	GQ900385.1	15,489–16,232	744	16
Unknown	SAP071A (26.9)	GQ900485.1	12,225–11,482	744	16
ORF1	pTZ2162 (35.4)	AB304512.1	798–55	744	16

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

Gene/ORF	Plasmid (size [kb])	GenBank accession no.	Position of <i>rep</i> gene	<i>rep</i> gene size (bp)	Rep family ^b
<i>rep</i>	pBORa53 (17.3)	AY917098.1	11,368–12,111	744	16
<i>repA</i>	pUB101 (21.8)	NC_005127.1	3,335–4,519	1185	19
<i>rep</i>	pWBG747 (33.7)	GQ900399.1	4,085–3,111	974	19
<i>CDS20</i>	pSJH901 (30.4)	CP000704	20,361–19,378	984	19
<i>rep</i>	pSA1379 (22.8)	AB255366.1	984–1	984	19
<i>ORF34</i>	EDINA (35)	AP003089.1	21,196–22,161	966	19
<i>repA</i>	SAP019A (27.4)	GQ900385.1	17,541–16,576	966	19
<i>repA</i>	pWBG759 (28.4)	GQ900401.1	13,995–14,622	628	19
<i>repA</i>	SAP071A (26.9)	GQ900485.1	10,081–11,055	975	19
<i>rep</i>	pWBG746 (33.7)	GQ900390.1	18,009–18,992	984	19
<i>ORF1</i>	EDINA (35)	AP003089	79–954	876	20
<i>repA</i>	pWBG753 (30)	GQ900395.1	590–1,525	876	20
<i>rep</i>	pTW20_1 (29.6)	FN433597.1	11,799–10,810	990	20
<i>repA</i>	SAP102A (36.1)	GQ900496.1	28,902–29,846	945	20
<i>repA</i>	pSK23 (42)	GQ900491.1	6,257–5,750	508	20
<i>repA</i>	SAP059A (26.2)	GQ900480.1	14,207–13,700	508	20
<i>repA</i>	SAP074A (27.3)	GQ900426.1	25,297–26,241	945	20
<i>repA</i>	SAP063A (26)	GQ900418.1	15,582–14,638	945	20
<i>repA</i>	SAP055A (20.5)	GQ900414.1	17,601–18,108	508	20
<i>rep</i>	SAP057A (39.3)	NC_013334.1	2,153–2,674	522	20
<i>repA</i>	VRSaP (25.1)	AP003367	315–1,250	936	20
<i>rep</i>	pWBG754 (2.2)	GQ900396.1	1,804–2,241, 1–561	999	21
<i>rep</i>	pNVH01 (2.7)	AJ512814.1	100–1,104	1005	21
<i>rep</i>	pS0385–3 (3.2)	AM990995.1	775–1,824	1050	21
<i>repRC</i>	pSK41 (46.4)	AF051917.1	15,017–15,907, 17,520–17,578	949	21
<i>repRC</i>	pGO1 (54)	FM207042.1	14,981–15,907	927	21
<i>rep</i>	pBMSa1 (2.8)	AY541446.1	939–1,943	1005	21
<i>rep</i>	pWBG760	GQ900473.1	2,801–3,796	996	21
<i>rep</i>	SAP071A	GQ900485.1	5,790–6,506	717	21
<i>rep</i>	pKH12 (3)	EU168704.2	146–1,141	996	21
<i>rep</i>	pKH14 (3.1)	EU164802.1	1,846–2,841	996	21
<i>rep</i>	pSA1308 (2.8)	AB254848.1	1–996	996	21
<i>rep</i>	pKH3 (3)	AF151117.1	146–1,141	996	21
<i>rep</i>	SAP101A (32.2)	GQ900495.1	1,089–1,805	717	21
<i>rep</i>	pKH21 (2.5)	EU350088.1	2,346–2,531, 1–819	1005	21
<i>repB</i>	pUB110 (4.5)	X03408.1	514–1,221	708	22
<i>repU</i>	pKKS825 (14.4)	FN377602.2	3,428–4,609	1182	22
<i>rep</i>	pPR9 (41.7)	GU237136.1	23,537–24,562	1026	23
<i>rep</i>	pV030–8 (39)	EU366902.1	100–1,125	1026	23
<i>rep</i>	pWBG745 (38.2)	GQ900389.1	33,459–34,448	990	24
<i>rep</i>	pWBG749 (38.1)	GQ900391.1	4,946–5,929	984	24
<i>repF</i>	pE194 (3.7)	M17811.1	495–1,094	600	Unique
<i>rep</i>	pKKS825 (14.4)	FN377602.2	11,218–12,033	816	Unique
<i>rep</i>	pKKS825 (14.4)	FN377602.2	1,518–2,879	1362	Unique
<i>rep2</i>	pDLK3 (1.4)	GU562626.1	273–857	585	Unique
<i>rep</i>	pAVX (17.3)	CP001784.1	10,018–11,301	1284	Unique
<i>rep</i>	pWBG764 (2.4)	GQ900468.1	353–1,318	966	Unique
<i>rep</i>	SAP015B	GQ900502.1	672–1,310	639	Unique
<i>repA</i>	SAP099B (16.4)	GQ900449.1	11,943–12,878	936	Unique
<i>CDS20</i>	pETB (38.2)	NC_003265	12,002–13,576	1575	Unique
<i>rep</i>	pSK1 (28.2)	GU565967.1	1,307–2,227	921	Unique

^a Only one plasmid per *rep* gene was included. ORF, open reading frame.

^b The new *rep* families and USs for *S. aureus* described in this study appear in bold.

plasmids of 2.5 kb with *rep* sequences similar to those of pKH21, pBMSa1, and pS0385-3 (14, 20). It is interesting to remark that small plasmids seem to remain more similar in molecular weight than larger plasmids, in which changes in size, probably due to genomic plasticity, appear to occur more frequently.

An association between resistance genotype and *rep* family was observed for some of the strains (Table 4). A specific combination

of resistance genes and plasmid families was already described for some strains in the previous study (11). Ten of our eleven *rep*₁₀-positive strains also carried *erm*(C), as is the case for pDLK1 (13). Two strains contained the gene *lmu*(A) and a *rep* gene similar to that of plasmid pBMSa1 (14). The *rep* gene of pGO1 (*rep*₂₁) with *ant*(4′)-Ia was detected in one strain. pVGA harbored *vga*(A) (7), and this resistance gene was identified in all our *rep*_{7b}-positive

Lozano et al.

TABLE 2 Primers used in this study for PCRs

Rep family ^a	Prototype	Size (bp)	Temp (°C) ^b	Primers (5' → 3')	Reference	GenBank accession no.
1	pIP501	624	56	TCGCTCAATCACTACCAAGC CTTGAACGAGTAAAGCCCTT	6	AJ505823
2	pRE25	630	56	GAGAACCATCAAGGCGAAAT ACCAGAATAAGCACTACGTACAATCT	6	X92945
3	pAW63	403	52	CCTAATGTATATAATTTGGTACATAT ACATTTTCCTCAAAGAACAT	11	BTH011655
4	pMBB1	430	52	ACTATGTCGTTGAGTCTAATGACT AGCAAGATAGAATATTTACTTTTAAGTTT	6	EFU26268
5	pSAS	257	50	CTTAAATCTACMTATTCWAAAMAYATGTT TCARCGTCAAAWGTRAACTCT	This study	BX571858
6	pS86	551	56	ACGAATGAAAGATAAAGGAGTAG TAAATTCAGTTTGGCAATCTTAT	6	AJ223161
7	pUSA02	227	52	AGACGTAATATGCGTRTTGA CCAAAATAYTTYGTTCTGG	11	NC_007791.1
7b	pC223	729	56	CTAATAGCCGGTTAGACGCAC GACGRGARTTCTATGTAATTCTCC	This study	NC_005243.1
8	pAM373	394	56	TAGATACGACAAAAGAAGATTACA CCAATCATGTAATGTTACAACC	6	NC_002630
9	pCF10	201	56	GCTCGATCARITTCAGAAAG CGCAAACATTTGTCWATTCTT	6	NC_006827
10	pDLK1	382	56	TATAAAGGCTCTCAGAGGCT CCAAATTCGAGTAAGAGGTA	11	GU562624.1
10b	pSK6	200	52	TAAATAAAGACTCAGGAGAAGTA TAGCAAGTTCTCGAACTGTT	11	U96610.1
11	pEF1071	500	52	TCTAGAATGCGTAAAAAGG CCTTTGAAGATWGCRGTWAG	11	AF164559
12	pBMB67	470		GAGCCTATAACAGAGTACACA CAAATATAGGCTTTGTAGTTC	11	DQ242517
13	pC194	402	52	ATGATGCAATATATTAAGCA TACCAGAATAYTTAGCCATTTT	11	NC_002013
14	pRI	164	52	GAAAGYTRGATAGYTTTGC RTTTTGRCTTCTTSYTTCA	11	EU327398
15	pUSA03	327	52	CAGTAGAAGAAAATTATAAAGAAC GTTATGGCTGGTTTAATAAAA	11	NC_007792.1
16	pSAS	592	52	CAGGAAAACACTTCGTTTAT CTTCTATATCACTATCATTGTCATT	11	NC_005951.1
17	pRUM	604	52	TACTAACTGTGGTAATTCGTTAAAT ATCAAGGACTCAACCGTAATT	6	NC_005000
18	pEF418	462	56	ACACCAGTCGAAATGAATTT AGGAATATCAAGTAATTCATGAAAGT	6	AF408195
19	pUB101	543	52	GWGATCGCTTARAYTTATCTAT YMTTGTSTGGMAATTCTT	11	NC_005127.1
20	EDINA	329	52	CTGTGAATYTGGAAGTTCC CTAAATATTTTGYGAAGATGC	This study	AP003089
21	pBMSa1	414	50	TAGTTATCAAGCTCARARAG GMTTSWATRTCTTTATCGCC	This study	AY541446.1
22	pUB110	486	56	TCCGTTCCCAATTCACATTGCAA TGCGTGCAACGGAAGTGACA	This study	X03408.1
23	pV030-8	293		TGGTCGTGACGCACATTACACA CGCTATTTTCTCCGTATCCGG	This study	EU366902.1
24	pWBG745	229		TCACAGAACTTCAAGAATTTCC	This study	GQ900389.1

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Rep family ^a	Prototype	Size (bp)	Temp (°C) ^b	Primers (5' → 3')	Reference	GenBank accession no.
				CCTTGCATAGTYTCAACACTTTC		
Unique	pMG1(pHTβ)	199	52	GTATTAACACACTGGACTC TCAGTGTAGGCAATAAACC	11	AB206333
Unique	pE194	303	54	GTGTCCATTGTCCATTGTCC GCATGCCAGTGCTGTCTATC	This study	M17811.1
Unique	pKKS825	320		AAGCAATGGCGAACAGTTGGT GTCCTCTTTTGCCCAATCTGGA	This study	FN377602.2
Unique	pKKS825	390	58	GAACGCTTCCTCAGCCGACT ACCACTCAGGAAACTTCTTCTGTC	This study	FN377602.2
Unique	pDLK3	450		ATCAGCACCTGAAGGGTGGGA AACGGAAACCAATCATCAAATCGA	This study	GU562626.1
Unique	pAVX	259		CCACGCACCTGTAGATGAACGTGT ACGTTTTGCCATCGATTGGAACGC	This study	CP001784.1
Unique	pWBG764	253		GTATCTGATTTCGTATTATTGG ATCTTTCAGCTACTACGTTC	This study	GQ900468.1
Unique	SAP015B	363		TTCTGTGACATCACGCCACAT GTGCATGGCGAAAGGCGAGA	This study	GQ900502.1
Unique	SAP099B	722		TTGCATGGCTTCGACACTTTC CTGACGCAAGGTTATGTATGCTCT	This study	GQ900449.1
Unique	pETB	924		GTCATTGGAGCCCTAATCC GACGAACGTAAGGATGATTAG	This study	NC_003265.1

^a The new *rep* families and USs for *S. aureus* defined in this study appear in bold.

^b Due to the lack of positive controls, only annealing temperatures of PCRs in which positive strains were detected are shown in the table. Moreover, a total of 51 amplicons were sequenced and compared to the *rep* genes described in the public databases to test if the primers worked correctly (data not shown).

strains. Two of the strains belonging to the *rep*₂₂ family carried *tet(L)* and *dfrK* resistance genes, similar to pKKS627, previously described. Two strains (K294 and K418) harbored the *ant(4')-Ia* gene associated with pUB110, with a *rep* gene similar to that of pKKS627 (16). Three strains belonging to the *rep*₂₂ family contained the genes *ant(4')-Ia*, *tet(L)*, and *dfrK*, similar to pKKS825 (12). However, the sizes of the plasmids that presumably carried

these genes in some of these strains was larger than that originally described. Hence, these plasmids might be mosaic plasmids which have conserved some resistance genes.

Our classification system showed some similarities with those presented by others. For example, some *rep* families (*rep*₇ and *rep*₁₀) contained plasmids with sizes in accordance with the subgroups pT181 and pSN2, or the plasmids pSAS and pMW2 were

TABLE 3 *rep* families detected in *S. aureus* strains according to their origins and clonal complexes

Methicillin resistance	Source	Clonal complex	No. of strains	No. of strains with:														No. of strains with no <i>rep</i> families detected			
				<i>rep</i> family																	
				2	5	6	7	7b	9	10	10b	13	15	16	20	21	22	Unique sequences			
																		pE194	pKKS825		
MRSA	Human	CC398	43	1	1	1	29	4	2	19	1	3				13	10	1	4	4	
		CC5	9							5				1			1	9			
		CC228	3													3	3				
		CC247	2				2											2			
		CC1	1			1	1			1				1	1						
		CC8	1			1	1			1						1		1			
		CC30	1			1	1			1					1						
	Animal	CC398	5			1	4			2	1						1	3			
	Food	CC398	2				1	1		2							2	1		1	
		CC5	2							1								2			
CC22		1			1										1						
MSSA	Animal	CC398	9				4			2						6				1	
		CC30	9				2			1						5				3	
		CC9	4				2									1				1	
Total				1	5	1	46	5	2	35	2	3	2	2	5	32	28	1	5	9	

TABLE 4 Plasmid content and related antimicrobial resistance genes of 18 selected MRSA strains

Strain (clonal complex)	Plasmid detected ^b		Southern blot		Resistance gene(s) possibly included in detected plasmid ^f	
	rep families (PCR/sequencing)	No. of plasmids	Plasmid sizes (kb)	Plasmid size (kb)		Similar plasmid(s) ^d (rep family)
C1894 (CC398)	7b, 10, 21, 22, US	7	300, 250, 90, 40, 15, 6, 2.5	90	pVGA (7b)	<i>vga(A)</i>
				40	pKKS825 (22)	<i>tet(L), ant(4')-Ia</i>
				15	pKKS825 (US)	<i>tet(L), ant(4')-Ia</i>
				6	pKKS825 (US)	<i>tet(L), ant(4')-Ia</i>
				2.5	pDLK1 (10) pKH21 (21)	<i>erm(C)</i>
C1890 (CC22)	5, 20	3	350, 47, 23	350	SAP102A (20)	
				47	pSAS (5)	
				23	pSAS (5)	
K264 (CC5)	10, 21, ^c 22	4	47, 20, 4.5, 2.5	20	pKKS825 (22)	<i>ant(4')-Ia</i>
				2.5	pDLK1 (10)	
K294 (CC30)	5, 10, 16, 22	5	300, 60, 30, 4, 2.5	300	pSAS (5) SAP019A (16)	
				60		<i>ant(4')-Ia</i>
				30		
				2.5		<i>erm(C)</i>
K418 (CC8)	7, 10, 20, 22	6	350, 120, 70, 40, 15, 2.5	350	pSBK203 (7)	
				120	pTW20_1 (20)	
				70	pTW20_1 (20) pTW20_1 (20)	
				2.5	pKKS627 (22) ^e pDLK1 (10)	<i>ant(4')-Ia</i> <i>erm(C)</i>
C1569 (CC1)	5, 7, 10, 15, 16	7	500, 400, 250, 70, 40, 25, 2.5	400	MSSA476 (7)	
				250	pUSA03 (15)	
				70	pSAS (5) pSAS (16)	
				40	pSAS (5)	
				25	pSAS (16)	
				2.5	pDLK1 (10)	<i>erm(C)</i>
C1570 (CC398)	7, 10, 21	5	12, 5, 4.3, 4, 2.5	12	pSBK203 (7)	
				2.5	pDLK1 (10) pKH21 (21)	<i>erm(C)</i>
C1576 (CC398)	7, 21	6	450, 65, 35, 12, 6.5, 2.5	12	pSBK203 (7)	
				2.5	pBMSa1 (21)	<i>lnu(A)</i>
C1571 (CC398)	7, 10	6	200, 112, 45, 20, 5, 2.5	200	pK214 (7)	
				45	pK214 (7)	
				20	pK214 (7)	
				2.5	pDLK1 (10)	<i>erm(C)</i>
C1813 (CC398)	7b, 10, 21, 22, US	8	300, 245, 90, 50, 18, 6.7, 6, 2.5	90	pVGA (7b)	<i>vga(A)</i>
				50	pKKS627(22)	<i>tet(L), ant(4')-Ia, dfrK</i>
				18	pVGA (7b)	<i>vga(A)</i>
					pKKS825 (US)	<i>tet(L), ant(4')-Ia, dfrK</i>
				6.7	pKKS825 (US)	<i>tet(L), ant(4')-Ia, dfrK</i>

(Continued on following page)

TABLE 4 (Continued)

Strain (clonal complex)	Plasmid detected ^b			Southern blot		Resistance gene(s) possibly included in detected plasmid ^f
	<i>rep</i> families (PCR/sequencing)	No. of plasmids	Plasmid sizes (kb)	Plasmid size (kb)	Similar plasmid(s) ^d (<i>rep</i> family)	
				2.5	pDLK1 (10) pBMSa1 (21)	<i>erm</i> (C)
C2354 (CC398)	7, ^c 7b	7	300, 280, 150, 80, 20, 9, 6	6	pVGA (7b)	<i>vga</i> (A)
C2669 (CC398)	5, 7, ^c 10b	6	300, 280, 160, 80, 20, 9	280	pRJ6 (5)	
				80	SAP104B (10b) pRJ6 (5)	
				9	SAP104B (10b) SAP104B (10b)	
C1857 (CC398)	7, 10, 21, 22	8	500, 280, 97, 60, 40, 20, 15, 2.5		pKKS627 (22)	<i>tet</i> (L), <i>dfr</i> K
				20	pK214 (7)	
				2.5	pDLK1 (10) pBMSa1 (21)	<i>erm</i> (C) <i>lnu</i> (A)
C1840 (CC398)	7, 22	7	500, 280, 97, 60, 40, 10, 5	280	pKKS825 (22)	
				97	pK214 (7)	
				10	pK214 (7)	
C2348 (CC398)	5, 7, 10b	7	200, 180, 80, 40, 20, 9, 5	200	pRJ6 (5)	
				180	pS0385-2 (7)	
				80	SAP104B (10b)	
				40	pRJ6 (5)	
				20	pRJ6 (5)	
				9	SAP104B (10b)	
C2350 (CC398)	10, 21, 22, US	4	130, 20, 9, 2.5	20	pKKS825 (US)	<i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia
				9	pKKS825 (22) pKKS825 (US)	<i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia <i>tet</i> (L), <i>ant</i> (4')-Ia
				2.5	pDLK1 (10) pS0385-3 (21)	<i>erm</i> (C)
C2876 (CC398)	US	7	110, 20, 11, 10, 7, 6.5, 4.4	11	pBS-02 (US)	
C2875 (CC398)	7b, 10, 22, US	7	245, 90, 48, 23, 8, 6, 2.5	90	pVGA (7b)	<i>vga</i> (A)
				23	pKKS825 (US)	
				8	pKKS825 (22)	
				6	pKKS825 (US)	
				2.5	pDLK1 (10)	<i>erm</i> (C)

AQ: H ^a Resistance phenotypes and genotypes of the strains are shown in Table S1 in the supplemental material.

^b The *rep* family was identified by PCR and sequencing, and the number and size of plasmids were determined by S1-PFGE.

^c Unknown localization (no positive results were obtained by S1-PFGE or I-CeuI-PFGE hybridizations).

^d Similar plasmid: plasmid carrying a *rep* gene identical to the detected one (performed by sequencing).

^e The *rep* gene of pKKS627 is similar to that of pUB110, in which the gene *ant*(4')-Ia is located.

^f These resistance genes were detected in the corresponding strains by PCR, and the possible plasmid location is suggested.

grouped in the *rep*₅ family (17, 21). However, as occurs in Novick classification, plasmids of the same family can belong to different incompatibility groups (19), and it is not possible based on a genotype, as in our study, to determine the exact incompatibility group. No chromosomal *rep* gene location was detected in our study.

Interestingly, *rep* families (*rep*₂, *rep*₆, and *rep*₉) previously found in other Gram-positive species were detected in *S. aureus* strains for the first time in our study, although at a very low percentage. This indicates plasmid transfer between genera and/or species. Transfer of streptococcal broad-host-range plasmids to a wide range of Gram-positive species, including those of *Staphylo-*

coccus, has been demonstrated before (9). However, *rep*₂ and *rep*₉ are believed to have a very narrow host range and have to date been described only for *Enterococcus*.

AQ: F

A relationship between some clonal complexes (CC) and some *rep* genes was detected (see Table S1 in the supplemental material). *rep* genes of pS0385-2 and pS0385-3, plasmids previously found in CC398, were identified in our study in strains belonged to this CC. Moreover, pTW20_1 (*rep*₂₀) was previously isolated from a MRSA clone belonging to a highly transmissible and multi-resistant CC8 isolate (10), and the *rep* gene of this plasmid was detected in MRSA CC8. Similarities in some plasmid patterns of *Enterococcus* strains belonging to the same CC have been discovered before (5). Moreover, in recent studies of plasmids in staphylococci, the pUSA300-like plasmids were found only in the USA300 clone strains (13, 21). Nonetheless, other *rep* genes seem to be more widespread. This is the case for pKKS627 and pKKS825 (*rep*₂₂ and US), since both were isolated from *S. aureus* CC398 strains and their *rep* genes have been detected in strains belonging to different CCs (CC398, CC5, CC8, and CC30) in this study. This fact suggests a potential transfer of mobile genetic elements and resistance genes among different clonal lineages of staphylococci.

MRSA CC398 usually displays a multiresistance phenotype. In this study, most strains belonging to this CC showed an elevated number of *rep* families, indicating that this CC has a high ability to capture different plasmids. Moreover, MRSA appears to be more likely to harbor plasmids than MSSA (2), so these mobile genetic elements could have played an indirect role in the evolution from MSSA to MRSA or the subsequent emergence of MRSA.

In conclusion, this study is the first step toward a classification system for *S. aureus* plasmids, which will help us to know more about the transmission and evolution of these mobile genetic elements.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. Carmen Lozano has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

We thank Jacob D. Jensen, Lisbeth Andersen, Inge M. Hansen, and Christina Aaby Svendsen for their technical assistance.

AQ: ref REFERENCES

- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226:235–240.
- Coia JE, Noor-Hussain I, Platt DJ. 1988. Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin-sensitive and methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and the community. *J. Med. Microbiol.* 27:271–276.
- Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (ed). 2006. Gram-positive pathogens, p 413–415. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Francia MV, et al. 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:79–100.
- Freitas AR, et al. 2011. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 49:925–931.
- García-Migura L, Liebana E, Jensen LB. 2007. Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:263–268.
- Gentry DR, et al. 2008. Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4507–4509.
- Gómez-Sanz E, et al. 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.
- Grohmann E, Muth G, Espinosa M. 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:277–301.
- Holden MT, et al. 2010. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J. Bacteriol.* 192:888–892.
- Jensen LB, et al. 2010. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods* 80:25–43.
- Kadlec K, Schwarz S. 2009. Novel ABC transporter gene, vga(C), located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3589–3591.
- Kuntová L, et al. Characteristics and distribution of plasmids in a clonally diverse set of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Arch. Microbiol.*, in press.
- Loeza-Lara PD, et al. 2004. pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. *Plasmid* 52:48–56.
- Lozano C, et al. 2011. Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17:138–140.
- Matsumura M, Katakura Y, Imanaka T, Aiba S. 1984. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J. Bacteriol.* 160:413–420.
- Novick RP. 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:537–565.
- Osborn M, et al. 2000. The evolution of bacterial plasmids, p 304–366. In Thomas CM, The horizontal gene pool. Harwood Academic Publisher, Amsterdam, the Netherlands.
- Projan SJ, Novick R. 1988. Comparative analysis of five related Staphylococcal plasmids. *Plasmid*. 19:203–221.
- Schijffelen MJ, Boel CH, van Strijp JA, Fluit AC. 2010. Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 11:376. doi:10.1186/1471-2164-11-376.
- Shearer JE, et al. 2011. Major families of multiresistant plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. G3 (Bethesda) 1:581–591.
- Udo EE, Grubb WB. 1991. A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78:33–36.

AQ: G

Table S1. Characteristics and results obtained for all *S. aureus* strains included in this study

Strain	Country	MRSA/MSSA ^a	Source	CC ^b / <i>spa</i>	SCC <i>mec</i>	Phenotype of resistance ^c	rep-families
C1891	Spain	MRSA	Food	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, STR	7, 10, 21
C1894	Spain	MRSA	Food	CC398/t1197	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB, KAN	7b, 10, 21, 22, US ^d
C1533	Spain	MRSA	Food	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, KAN, CIP	10, 22
C1532	Spain	MRSA	Food	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, KAN, CIP, LEV	22
C1890	Spain	MRSA	Food	CC22/t032	IV	PEN, OXA, CIP, LEV	5, 20
K264	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, CIP, LEV, FOS	10, 21, 22
K287	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, CIP, LEV	22
K292	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, CIP, LEV	10, 22
K294	Spain	MRSA	Human	CC30/t012	III	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, CIP, LEV	5, 10, 16, 22
K370	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, GEN, CIP, LEV	10, 22
K168	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, CIP, LEV	22
K388	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, CIP, LEV	10, 22
K415	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	TOB, CIP, LEV	15
K126	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, CIP, LEV	10, 22
K181	Spain	MRSA	Human	CC5/t067	IV	PEN, OXA, TOB, CIP, LEV	22
K418	Spain	MRSA	Human	CC8/t008	IV	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, CIP, LEV	7, 10, 20, 22
K118	Spain	MRSA	Human	CC228/t109	I	PEN, OXA, TOB, GEN, CIP, LEV	20, 21
K413	Spain	MRSA	Human	CC228/t1318	I	PEN, OXA, ERY, CLI, TOB, GEN, CIP, LEV	20, 21
K102	Spain	MRSA	Human	CC228/t1318	I	PEN, OXA, TOB, GEN, CIP, LEV, FOS	20, 21
K392	Spain	MRSA	Human	CC247/t051	I	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB, GEN, CIP, LEV	7, 22
K399	Spain	MRSA	Human	CC247/t051	I	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB, GEN, CIP, LEV	7, 22
C1569	Spain	MRSA	Human	CC1/t127	II	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP, LEV	5, 7, 10, 15, 16
C1570	Spain	MRSA	Human	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI	7, 10, 21
C1576	Spain	MRSA	Human	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	7, 21

C1571	Spain	MRSA	Human	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, CIP ¹ , LEV ¹	7, 10
C1660	Spain	MRSA	Human	CC398/t1255	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI	7, 10
C1813	Spain	MRSA	Human	CC398/t1197	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	7b, 10, 21, 22, US
C1650	Spain	MRSA	Pig	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, GEN, TOB, KAN, SXT	10
C2354	Spain	MRSA	Human	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, CLI, CIP, LEV	7, 7b
C2669	Spain	MRSA	Pig	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, CLI, CIP, LEV	5, 7, 10b
C1857	Spain	MRSA	Human	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB, SXT	7, 10, 21, 22
C1858	Spain	MRSA	Human	CC398/t588	V	PEN, OXA, ERY, CLI, TET, TOB, SXT	7, 10, 21
C1859	Spain	MRSA	Human	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, SXT	7, 22
C1840	Spain	MRSA	Pig	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, SXT, CIP ¹ , LEV ¹	7, 22
C1849	Spain	MRSA	Pig	CC398/t011	IV	PEN, OXA, TET, GEN, TOB, KAN, SXT	7, 21, 22
C1842	Spain	MRSA	Pig	CC398/t011	IV	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB, KAN ¹ , SXT	7, 10, 22
C2895	Spain	MRSA	Human	CC398/t1451	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI	7, 7b, 10
C1992	Spain	MRSA	Human	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, GEN, TOB, KAN	10, 21
C2348	Spain	MRSA	Human	CC398/t011	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, CIP, LEV, SXT	5, 7, 10b
C2350	Spain	MRSA	Human	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB	10, 21, 22, US
C2876	Spain	MRSA	Human	CC398/t899	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB	US
C2875	Spain	MRSA	Human	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, ERY, CLI, TOB	7b, 10, 22, US
C2767	Spain	MRSA	Human	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET	21
102/M-1-B-FAA	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t2462	-		21
111/74-13479-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-	PEN, ERY	21
115/3-S-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t108	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	7, 13
116/9-B	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, ERY, TET, TMP	7, 10, 21
130/73-10169-1	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	TET	7, 21
131/72-15311-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-	PEN, TET	7
132/74-10089-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-		

133/74-12791-1	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	PEN, TET, STR, TMP	7
134/74-13093-4	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	PEN, TET, ERY, TMP	21
137/2007-70-52-4	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	7
142/74-13714-1	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	PEN, TET, TMP	21
143/73-11242-1	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	ERY, TET, STR	7, 10
144/74-13727-1	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	PEN, TET, ERY	10, 21
145/74-13532-2	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t011	-	PEN, TET	
146/75-12166-1	Denmark	MSSA	Pig	CC398/t034	-	PEN, TET, ERY, TIA, STR, TMP	7, 21
216/73-10127-2	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-	PEN	
217/74-11696-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-	TET, STR	7, 21
222/72-12400-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-		
223/72-13076-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-	PEN	21
224/72-13279-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-		21
225/72-14665-1	Denmark	MSSA	Pig	CC30/t1333	-	TIA, TMP	21
226/73-10164-1	Denmark	MSSA	Pig	CC9/t337	-	SMX	10
227/73-12750-1	Denmark	MSSA	Pig	CC9/t337	-	PEN, TIA, SMX, TMP	
228/74-10095-1	Denmark	MSSA	Pig	CC9/t337	-	PEN, TIA, STR, TIA, TMP	7, 21
229/72-10804-1	Denmark	MSSA	Pig	CC9/t337	-	PEN, TMP	7
2008-60-3431	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TMP, STR	7
2007-70-70-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, TMP	
170/2007-70-71-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, TMP	US
95018	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, TIA, STR, TMP, SMX	13
98699	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, STR, TMP	7
2008-60-3397	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, CIP, TMP	10
2008-60-3326	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	7
2008-60-3254	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, STR, TMP	7, 10
2008-60-2816	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, GEN, STR, TMP, SMX	7
2008-60-2593	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, ERY, GEN, STR, TMP, SMX, SXT	2, 7, 9, 21
2008-60-970	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, STR, TMP	7, 21
2007-70-77-4	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET	
2007-70-91-4	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TMP	7

2008-243-2	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TMP	
2008-251-4-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, LIN, TIA, GEN, STR, TMP, SMX	6, 7, 13
2008-70-269-2	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, LIN	7, 10
2008-70-151-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, GEN, STR, TMP, SMX, CIP	
FI-A-S	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY	7, 10
2A3S	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, LIN, TMP	10, 21
Nr10 72398	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, TIA, STR, TMP, SMX, CIP	7, 10, 21, 22
Nr35 62450	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, LIN, TIA, GEN, STR, TMP, SMX, CIP	7, 9, 10, 22
2008-70-300-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, ERY, LIN, TIA, STR, TMP, CIP	7, 10, 22
2008-70-301-1	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, LIN, TIA, STR, TMP, CIP	7, 22
Nr17 104659	Denmark	MRSA	Pig	CC398/t034	V	PEN, OXA, TET, TIA, STR, TMP, CIP	7, 22

^aMRSA, methicillin resistant *S. aureus*; MSSA, methicillin susceptible *S. aureus*.

^bCC, Clonal Complex

^cPEN, penicillin, OXA, oxacillin, TET, tetracycline; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; LIN, lincomycin, TIA, tiamulin, GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin, CIP, ciprofloxacin, LEV, levofloxacin, TMP, trimethoprim, SMX, sulfamethoxazole, SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; [†], intermediate.

^dUS, unique sequence

Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA: Mecanismo de Resistencia, Tipado Molecular y Epidemiología

Carmen Lozano Fernández*
Elena Gómez Sanz*
Myriam Zarazaga Chamorro
Carmen Torres Manrique

Universidad de La Rioja
Complejo Científico Tecnológico
Departamento de Agricultura y Alimentación
Área de Bioquímica y Biología Molecular
C/ Madre de Dios 51
CP 26006, Logroño, La Rioja, España
carmen.torres@unirioja.es

*Estos autores han contribuido igualmente a este capítulo

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que forma parte de la microbiota normal de individuos sanos pero que puede causar una amplia variedad de enfermedades de distinta gravedad. La aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) supone un grave problema de Salud Pública. El principal mecanismo de esta resistencia está mediado por el gen *mecA*, codificante de una proteína modificada de baja afinidad por los beta-lactámicos. Este mecanismo de resistencia se traduce en un grave problema terapéutico ya que implica resistencia a todos los beta-lactámicos, antibióticos de elección para estas infecciones.

Las cepas SARM se asociaban tradicionalmente al ambiente hospitalario siendo responsables de brotes de infecciones nosocomiales. Sin embargo, en la década de los 90 empezaron a detectarse infecciones por SARM adquiridas en la comunidad. En la actualidad la prevalencia de estas cepas está aumentando de modo alarmante en algunos países. SARM también puede colonizar o causar infecciones en animales, siendo un problema emergente en medicina veterinaria. Muy recientemente, diversas publicaciones alertan de la diseminación de una nueva variante de SARM de origen animal denominada ST398. Esta variante se detectó por primera vez en 2005 en países del centro de Europa, pero también ha sido aislada en otros países europeos, América y Asia. Los cerdos constituyen un importante reservorio de SARM ST398 aunque también se ha aislado en otras especies animales de producción. El contacto con los animales supone un riesgo ya que puede ser transferido al hombre, habiéndose reportado infecciones y colonizaciones nasales en humanos por esta variante. SARM ST398 también ha sido aislado ocasionalmente en alimentos y, aunque la posible transmisión al hombre por vía alimentaria o por manipulación de alimentos contaminados es baja, no debe descartarse. El tipado molecular constituye una importante herramienta para caracterizar las distintas variantes de SARM.

Palabras clave: SARM, tipado molecular, epidemiología, SARM-AH, SARM-AC, ST398.

Staphylococcus aureus: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

El término *Staphylococcus* viene del griego *staphyle* (racimo) y *kokkos* (granos), denominación otorgada por Rosenbach en 1884. Este género bacteriano debe su nombre a su estructura microscópica, ya que se observan como cocos Gram positivos, inmóviles, no esporulados y agrupados en agregados irregulares (racimos), (Figura 1). Son microorganismos mesófilos, con temperatura de crecimiento óptima entre 35 y 37°C, anaerobios facultativos y con metabolismo respiratorio y fermentativo.

En: **“Antibióticos: uso, mecanismos de acción, de resistencia y antibioterapia”**. Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Lozano-Zarain Patricia y Martínez-Laguna Ygnacio. (Eds.). 2009. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. pp. 239-270. ISBN 978-607-487-086-2.



FIGURA 1. Tinción de Gram de *Staphylococcus* spp.

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae* e incluye 41 especies y 24 subespecies (<http://www.bacterio.net>, última actualización en noviembre 2009), siendo la mayoría de ellas aerobias o anaerobias facultativas. *Staphylococcus aureus* es la especie principal, la más conocida y virulenta del género, recibe este nombre porque generalmente forma colonias de color amarillo o anaranjado en medio sólido debido a la producción de un pigmento carotenoides, aunque en ocasiones pueden ser colonias blancas. Se trata de un microorganismo que es DNasa y coagulasa positiva (CPS), lo que lo diferencia de otras especies del género denominadas coagulasa negativas (CNS), catalasa positiva y oxidasa negativa, produce ácido con la lactosa, maltosa y manitol, reduce los nitratos, hidroliza la urea y reduce el azul de metileno. Es por lo general fosfatasa positiva y la mayoría de las cepas son hemolíticas en agar sangre de caballo. La producción del pigmento amarillo dorado es probablemente la característica más variable. Los cultivos jóvenes pueden no producir ningún pigmento.

Para la identificación de esta especie se pueden utilizar diferentes pruebas microbiológicas como la tinción de Gram y bioquímicas como la reacción de la coagulasa o la DNasa, o bien sistemas automatizados como el MicroScan o las tarjetas VITEK. Se pueden utilizar también métodos moleculares para la detección de genes característicos como la PCR especie-específica, destacando el gen *nuc* (Brakstad *et al.*, 1992), que codifica una termonucleasa extracelular, la secuenciación de la región polimórfica del gen *spa* (Harmsen *et al.*, 2003) o de regiones conservadas del rDNA 16S.

S. aureus COMO AGENTE PATÓGENO OPORTUNISTA

S. aureus es un patógeno oportunista que se encuentra habitualmente formando parte de la microflora normal de la piel, nariz, boca, faringe, tracto intestinal o vagina, sin causar enfermedades, siendo la localización más frecuente la colonización nasal. Aproximadamente un tercio de la población humana sana está colonizada de forma intermitente y otro tercio es portadora nasal continua de *S. aureus* (Gordon and Lowy, 2008). También se encuentra, como comensal o como causante de infecciones, en animales de distintas especies (mamíferos y aves principalmente), y recientemente se ha descrito en animales exóticos (Walther *et al.*, 2008).

La eliminación de portadores nasales puede reducir la incidencia de infecciones por *S. aureus*. Actualmente la mupirocina es el antibiótico tópico de elección para la erradicación de portadores (Doebbeling *et al.*, 1993), pero su uso repetido y prolongado puede conducir a la resistencia a este antibiótico (Miller *et al.*, 1996).

Existen otras especies del género *Staphylococcus* que están también presentes en la mucosa y en la piel de los humanos y de otros mamíferos y aves, este es el caso de *S. epidermidis* (mayor incidencia), *S. saprophyticus* o *S. haemolyticus*, entre otros, los cuales predominan en humanos y de *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* o *S. schleiferi*, entre otros, predominantes en animales de compañía (principalmente en perros y gatos).

S. aureus es la especie que se asocia con más frecuencia a las enfermedades en humanos, siendo un agente habitual en las infecciones plégenicas y en las toxoinfecciones alimentarias (Banwart, 1982).

La patogenicidad de *S. aureus* se caracteriza por la posibilidad de producción de determinadas enzimas y toxinas que son considerados factores de virulencia, ya que favorecen la invasión celular, la degradación de células del sistema inmunitario y de tejidos, facilitan la multiplicación de la bacteria e intervienen en la aparición de síntomas en los diferentes cuadros clínicos. Entre los determinantes de virulencia se encuentran componentes de la pared celular (cápsula mucoide polisacáridica, adhesinas, proteína A, ácidos teicoicos,...), enzimas (coagulasa, hialuronidasa, catalasa, termonucleasas...) y diferentes toxinas (Gordon and Lowy, 2008). En la tabla 1 se describen algunas de las toxinas más conocidas y habituales de *S. aureus*.

S. aureus se asocia normalmente a furúnculos, orzuelos, impétigo y otras enfermedades superficiales del tejido cutáneo y subcutáneo, pero es capaz de provocar un amplio espectro de cuadros infecciosos y toxigénicos, estando implicado en brotes o epidemias hospitalarias y comunitarias. El mayor riesgo tiene lugar en personas debilitadas ya sea por una enfermedad crónica, por inmunodepresión, o por una herida traumática o quemadura, entre otros. En estos casos se favorece la penetración del microorganismo hasta otros tejidos pudiendo derivar en patologías más graves como neumonía, meningitis, miocarditis, pericarditis, endocarditis, abscesos o bacteriemias.

Este microorganismo también se relaciona con intoxicaciones alimentarias pero, en este caso, las responsables son las enterotoxinas producidas durante el crecimiento de la bacteria en el alimento.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LAS TOXINAS MÁS CONOCIDAS DE S. AUREUS

CUADRO CLÍNICO	FACTOR DE VIRULENCIA	FUNCIÓN	GENES
Síndrome de shock tóxico (SST), síndrome estafilocócico de la piel escaldada, intoxicación alimentaria y sepsis.	Toxina TSS-1	SST	<i>tsst-1</i>
	Toxinas exfoliativas	Epidermolisis	<i>eta, etb, etc, etd</i>
	Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria	<i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser, seq, seu</i>
Enfermedades de la piel invasivas, pulmonía necrotizante y destrucción de tejidos.	Leucocidinas (especialmente LPV)	Alteración de la permeabilidad celular, destrucción leucocitaria	<i>lukS-PV/lukF-PV</i>
	Hemolisinas	Ruptura de membranas celulares	<i>hla, hlb, hid, hlg, hlg-2</i>

Staphylococcus aureus RESISTENTE A METICILINA (SARM)

S. aureus presenta una gran capacidad para adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos. En la década de los 40 se introdujo la penicilina como tratamiento de las infecciones estafilocócicas y tan solo un año después empezaron a detectarse cepas *S. aureus* resistentes a penicilina. Esta resistencia se debida a la acción de penicilinasas, enzimas β-lactamasas capaces de hidrolizar el antibiótico. Actualmente, más del 90% de las cepas de *S. aureus* presentan esta resistencia.

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 estas β-lactamasas. En 1961, dos años después de la introducción de este fármaco, aparecieron cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Desde entonces se ha observado una gran diseminación de estas cepas en muchos hospitales, y actualmente SARM es considerado como uno de los patógenos más importantes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo.

El principal mecanismo de resistencia a la meticilina es la síntesis de una proteína fijadora de penicilina modificada, denominada PBP2a o PBP2' (Penicillin Binding Protein). Esta nueva proteína está codificada por el gen *mecA* localizado en el elemento cromosómico *SCCmec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*).

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 la PBP2a que presenta baja afinidad por los antibióticos β-lactámicos. Esto permite que aunque las PBPs habituales sean inhibidas por el antibiótico, la PBP2a sea capaz de mantener la síntesis del peptidoglicano. De esta forma, las cepas SARM que presentan este mecanismo, son resistentes a meticilina y a todos los β-lactámicos, incluidas las cefalosporinas y los carbapenemos, lo que supone un importante problema terapéutico, debido también a la extraordinaria capacidad de los estafilococos para adquirir resistencias a otros antimicrobianos.

Se han descrito otras modalidades de resistencia a meticilina en las que no se demuestra la presencia del gen *mecA* ni de la proteína PBP2a. Este es el caso de cepas con resistencia limitada a oxacilina. En estas cepas la resistencia es debida a una hiperproducción de penicilinasas o a una alteración de las PBPs nativas (McDougal and Thornsberry, 1986; Tomasz *et al.*, 1989).

TIPADO MOLECULAR

Con el fin de entender la epidemiología de SARM, conocer los clones predominantes implicados en brotes e infecciones tanto en el ámbito hospitalario y comunitario como en el alimentario, así como conocer las variantes asociadas a determinados ambientes y especies animales, y su especificidad y/o transmisibilidad, se han desarrollado diferentes técnicas de tipado molecular para,

en última instancia, llevar a cabo un mayor control de la diseminación de SARM y tomar las medidas necesarias para ello.

Durante los últimos años se han venido desarrollando múltiples técnicas de tipado para la caracterización de las cepas SARM, sin embargo, sin el establecimiento de un consenso en el método óptimo, se opta por la caracterización empleando varias de las técnicas establecidas. A continuación se exponen los fundamentos de algunos de estos métodos de tipado molecular de SARM.

A) TIPADO DEL SCCmec

Es una técnica basada en el análisis del polimorfismo asociado al SCCmec que contiene al gen *mecA*. Los principales elementos del SCCmec, así como sus funciones se describen a continuación.

El gen *mecA* codifica la PBP2a y está regulado por dos genes, *mecI* y *mecR1*. 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 de una proteína integral de membrana codificada por el gen *mecR1*, esto induce a una proteasa autocatalítica que inactiva al represor con lo que el operador de *mecA* queda libre expresándose la PBP2a (Zhang *et al.*, 2001). Se han diferenciado distintas clases genéticas del complejo *mec*, que comprende el gen *mecA*, estos genes reguladores y las secuencias de inserción IS431 e IS1272 (Tabla2).

De esta forma, el gen *mecA* forma parte de una isla genómica conocida como SCCmec que está integrada en el cromosoma de *S. aureus*. Aunque el origen del gen *mecA* no está del todo claro, se cree que proviene de la especie *Staphylococcus sciuri* (Wu *et al.*, 2001). No se conoce con exactitud el mecanismo de adquisición del mismo, pero existen dos genes, *ccrA* y *ccrB*, presentes en el elemento SCCmec, que codifican recombinasas capaces de escindir e integrar el elemento *mec* en el cromosoma.

El genoma de *S. aureus* se encuentra en constante cambio, adquiriendo genes que permiten a la bacteria ser resistente a los antibióticos utilizados contra ella. Muestra de esta capacidad de cambio es la presencia no sólo de recombinasas sino también de elementos de inserción como el IS431. Así, dentro del SCCmec (Figura 2) podemos encontrar genes de resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos, eritromicina, clindamicina, rifampicina, tetraciclina o trimetoprim-sulfametoxazol (Hiramatsu *et al.*, 1999). Este es el caso del gen *ermA* que confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas o del gen *ari4'* que codifica una enzima nucleotídi-transferasa responsable de la resistencia a algunos aminoglucósidos (Deurenberg and Stobberingh, 2008).

Se han descrito distintos tipos de SCCmec en función de las características de los genes *ccr* y de las secuencias adyacentes, de la variabilidad del complejo *mec* y sus genes reguladores y de determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones (Ito *et al.*, 2001). Hasta el momento se conocen 8 tipos de SCCmec y diferentes subtipos clasificados en base a la secuencia de las regiones J (junkyard) (Tabla 3).

TABLA 2. CLASES DE COMPLEJO MEC DE S. AUREUS

CLASE DE COMPLEJO <i>mec</i>	ESTRUCTURA
A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>
B	IS431- <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i> -IS1272
C1	IS431 ^a - <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^a
C2	IS431 ^b - <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^b
D	IS431- <i>mecA</i> -Δ <i>mecR1</i>

^aCon la misma orientación; ^bCon distinta orientación.
Tomado de: Deurenberg and Stobberingh, 2008.

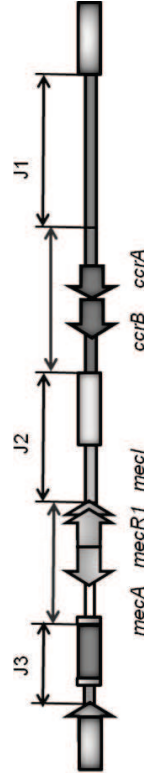


FIGURA 2. Representación gráfica de las partes fundamentales del SCCmec: complejo *mec*, *ccr* y regiones J.

TABLA 3. TIPOS DE SCCmec DE *S. aureus*.

TIPO SCCmec ^{1,2}	TIPO <i>ccr</i>	COMPLEJO <i>mec</i>
I	<i>ccrA1ccrB1</i>	B
II	<i>ccrA2ccrB2</i>	A
III	<i>ccrA3ccrB3</i>	A
IV	<i>ccrA2ccrB2</i>	B
V	<i>ccrC</i>	C2
VI	<i>ccrA4ccrB4</i>	B
VII	<i>ccrC</i>	C1
VIII	<i>ccrA4ccrB4</i>	A

¹Deurenberg and Stobberingh, 2008; ²IWG-SCC, 2009

Todavía existe mucho por descubrir sobre el sistema SCCmec, de hecho, hoy en día existen multitud de cepas con SCCmec no tipables hasta el momento. Por un lado, Skov *et al.*, 2009 proponen dos nuevos tipos de SCCmec: SCCmec tipo IX con una combinación del complejo *mec* C2 y *ccr* tipo 1 y el SCCmec tipo X en el que se combinan el complejo *mec* C1 con una nueva combinación de *ccr* (*ccrA1ccrA6*). Por otro lado, se han observado SCCmec con dos tipos de *ccr* o que no contienen el gen *mecA* (IWG-SCC, 2009).

B) TIPADO DEL LOCUS *agr*

El locus *agr* (accessory gene regulator) fue descrito por primera vez en *S. aureus*, pero se trata de un sistema de regulación global en el género *Staphylococcus*. 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 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).

El locus *agr* consta de varios genes: *agrB* que codifica una proteína de membrana encargada de la translocación y modificación de AgrD; *agrD* que codifica un octapéptido precursor del AIP; *agrC* codificante de una proteína de membrana receptora de la señal AIP y *agrA* codificante del regulador de respuesta AgrA que cuando está fosforilado se une al promotor y activa la transcripción (Figura 3).

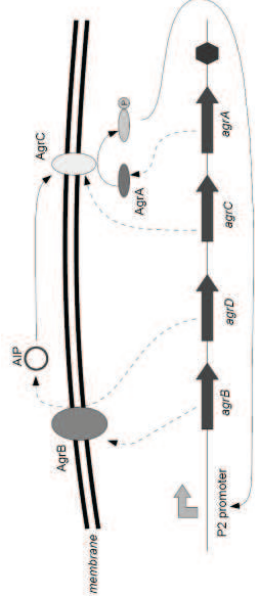


FIGURA 3. Organización del locus *agr*.

Las cepas de *S. aureus* se pueden clasificar en función del tipo de locus *agr* que presenten, existiendo cuatro tipos para esta especie. Se ha visto como cepas pertenecientes a un mismo grupo pueden activar la respuesta *agr* en otras cepas de ese mismo grupo e inhiben a aquellas que pertenecían a otro grupo. Se trata de una forma de interferencia entre bacterias (Shopsin *et al.*, 2003).

Se ha sugerido, además, que estos grupos de *agr* pueden influir en la capacidad de *S. aureus* para colonizar al huésped compitiendo con otras bacterias incluyendo otras especies de *Staphylococcus*. Esto afecta también a la transmisión entre hospedadores y a la epidemiología de los diferentes clones de *S. aureus* (Shopsin *et al.*, 2003). Además, se ha estudiado cómo la expresión del *agr* parece ser importante durante las etapas tempranas de la infección por *S. aureus* (Traber *et al.*, 2008).

C) TIPADO SEGÚN MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

Multilocus Sequence Typing (MLST) es una técnica desarrollada en 1998 (Maiden *et al.* 1998) que consiste en el análisis de la secuencia nucleotídica de fragmentos internos (unas 500pb) de ciertos genes "housekeeping" que codifican enzimas metabólicos. Este análisis permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables (Dominguez *et al.*, 2005). En el caso de *S. aureus*,

esta técnica se utilizó por primera vez en el año 2000 y los siete genes "housekeeping" utilizados fueron: *arcC* (carbamato quinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *gfpF* (glicero quinasa), *gmk* (guanilato quinasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *tpi* (triosafosfato isomerasa) y *yqjL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (Enright *et al.*, 2000). La secuencia de estos genes se compara con los alelos conocidos y accesibles en la página www.mlst.net y el perfil alélico obtenido permite deducir la secuencia tipo (ST) de la cepa. Por último, el algoritmo basado en secuencias tipo (STs) relacionados (BURST) se usa para definir los diferentes complejos clonales (CCs).

También se emplea esta técnica de tipado para otras especies del género *Staphylococcus*: *S. epidermidis* (Thomas *et al.*, 2007) y recientemente ha sido descrita para *S. pseudintermedius* (Bannoerh *et al.*, 2007).

D) TIPADO DE LA REGIÓN POLIMÓRFICA DEL GEN *spa*

La técnica del "spa-typing" fue desarrollada en 1996 (Frenay *et al.*, 1996), y se basa en la amplificación y posterior secuenciación de una región polimórfica del gen que codifica la proteína A (*spa*). Este gen sufre adiciones y/o pérdidas de los fragmentos repetidos así como mutaciones espontáneas en estas regiones. De esta forma, analizando el número de repeticiones y su variabilidad se pueden asignar distintos tipos (*spa*-types) (Harmsen *et al.*, 2003). Esta técnica resulta de gran interés debido a su rapidez y sencillez (Shopsin *et al.*, 2000). Además, se ha observado una buena correlación entre los MLST y los *spa*-types (Oliveira *et al.*, 2002) en muchos casos. Por otra parte, se ha observado que tiene un poder de discriminación entre PFGE y MLST (Malachowa *et al.*, 2005). Esta técnica se ha descrito también recientemente en la especie *S. pseudintermedius*, la cual presenta una proteína A putativa a la de *S. aureus* (Moodley *et al.*, 2009).

E) ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE)

La técnica de PFGE se basa en la generación de fragmentos de restricción de gran tamaño al digerir el ADN de una bacteria con enzimas endonucleasas de baja frecuencia de corte. Los patrones obtenidos para las distintas cepas pueden ser comparados y permite establecer relaciones genéticas entre ellas. Esta técnica se empleó por primera vez en *S. aureus* en 1995 (Bannerman *et al.*, 1995) y desde entonces es uno de los métodos de tipado más empleados.

Se considera que es la técnica más discriminativa para el estudio de *S. aureus* siendo muy utilizada para el estudio de brotes hospitalarios. La enzima utilizada para la digestión del ADN cromosómico en este caso es *SmaI*. Una vez obtenidos los perfiles electroforéticos de cada aislado, éstos se analizan teniendo en cuenta los criterios de Tenover *et al.*, 1995. Para poder comparar los datos obtenidos mediante esta técnica se requiere de un protocolo y una nomenclatura común. Este objetivo se ha intentado llevar a cabo en múltiples ocasiones dando lugar a la elaboración del HARMONY PFGE protocolo (Murchan *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos años está emergiendo una nueva variante genética tipada por MLST como ST398 que resulta no tipable (NT) por PFGE (Voss *et al.*, 2005). Esto se debe a una metilación en las bases adenina y citosina que impide el corte por la enzima *SmaI* (Bens *et al.*, 2006). En la actualidad, existen numerosos trabajos en los cuales se está ensayando con otras enzimas como *XmaI*, *ApaI*, *BstZl*, *SacI* o *Cf9I* con el fin de poder utilizar esta técnica en cepas pertenecientes a la secuencia tipo ST398 (Rasschaert *et al.*, 2009; Bosch *et al.*, 2009).

En la tabla 4 se presentan las ventajas y desventajas de las distintas técnicas de tipado de SARM descritas.

TABLA 4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TÉCNICAS DE TIPADO MOLECULAR DE SARM

TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
SCCmec-typing	Relativamente rápida Fácil comparación entre laboratorios Nomenclatura estándar	Errores en su propia clasificación al haber multitud de cepas no tipables → Bajo poder discriminatorio (8-10 tipos) No correlación perfecta con ST y spa-typing
agr-typing	Rápida Fácil comparación entre laboratorios Nomenclatura estándar	Bajo poder discriminatorio (4 tipos)
MLST	Fácil comparación entre laboratorios Nomenclatura estándar	Insuficiente poder discriminatorio (> 1300 tipos) Bajo rendimiento Alto coste
spa-typing	Rápida Alto rendimiento Fácil comparación entre laboratorios Nomenclatura estándar	Moderado poder discriminatorio (6023 tipos) Errores en la clasificación ST
PFGE	Alto poder discriminatorio (tantos tipos como clones haya)	Exigencia técnica, lenta Limitada comparación entre laboratorios Múltiples nomenclaturas

Tomado de Struelens *et al.*, 2009

EPIDEMIOLOGÍA DE S. aureus RESISTENTE A METICILINA

S. aureus es un importante patógeno ya que combina la producción de toxinas con una importante capacidad invasiva, a lo que hay que añadirle su capacidad para adquirir resistencias a diferentes antibióticos. En los últimos años se ha producido un dramático incremento de la prevalencia de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos, sobre todo a meticilina.

Como ya se ha comentado, tan sólo un año después de la introducción de la meticilina se aisló la primera cepa de SARM, en un hospital de Reino Unido (Jevons, 1961). El primer brote descrito de SARM fue en 1963 en un hospital infantil (Stewart and Holt, 1963) y desde entonces la prevalencia de cepas SARM ha ido aumentando en todos los hospitales del mundo, detectándose en los años 90 las primeras cepas SARM en pacientes de la comunidad (Udo *et al.*, 1993; Gross-Schulman *et al.*, 1998).

La epidemiología de SARM ha sufrido importantes cambios en los últimos años, se distinguen clones asociados a ambientes hospitalarios (SARM-AH) y los asociados a ambientes comunitarios (SARM-AC), los cuales presentan características diferenciales (Deurenberg and Stobberingh, 2008). Además, recientemente están surgiendo infecciones en la comunidad producidas por clones cuyo origen parece estar relacionado con animales de producción (SARM-LA). (Wulf and Voss, 2008)

A) SARM ASOCIADO A AMBIENTES HOSPITALARIOS (SARM-AH).

Desde que se aisló la primera cepa SARM se ha ido diseminando en el ámbito hospitalario sin restricciones geográficas. Pocos años después surgieron brotes en otros países europeos y durante los años 70 se extendió a Australia, Japón y Estados Unidos. En la actualidad, este microorganismo causa un alto porcentaje de las infecciones nosocomiales en todo el mundo (Grundmann *et al.*, 2006).

En algunos centros hospitalarios, más de la mitad de los aislados de *S. aureus* son resistentes a meticilina. La prevalencia varía mucho de unos países a otros y de unos hospitales a otros. A nivel mundial, pese a no existir información de todos los países, entre aquellos que ofrecen datos, existe un gradiente de prevalencia, dándose unos valores bajos (5-10%) en Canadá y Arabia Saudita y valores medios (10-25%) en Méjico, Venezuela, Túnez, Marruecos y la India. La prevalencia aumenta considerablemente en Estados Unidos, Brasil, Chile, Sudáfrica y Australia, entre otros, la cual llega hasta el 50%. Colombia y Japón se encuentran entre los países que sobrepasan los valores del 50% (Grundmann *et al.*, 2006). En Europa, según los datos publicados por el Sistema de Vigilancia Europeo de Resistencias (www.earss.rivm.nl), existe un gradiente de prevalencia de norte a sur. En países del norte como, Finlandia, Suecia, Noruega y Dinamarca, además de Holanda, la incidencia es menor (<1%), mientras que en la mayoría de países centro-europeos se encuentran valores medios (10-25%) y en países del sur (Francia, Italia, España, Croacia, Turquía) y Reino Unido se estima un porcentaje de SARM entre el 25 y el 50%. Estas diferencias pueden ser

debidas a las distintas políticas de uso de antibióticos, la diferente presión selectiva y los programas de control de la infección. Existen muy pocos datos de referentes a África y Asia.

En muchas ocasiones estas infecciones están asociadas a brotes hospitalarios producidos por determinados clones epidémicos. (Deurenberg and Stoberingh, 2008). Existen unos factores de riesgo establecidos para los pacientes con infecciones por SARM (inmunodeprimidos, cirugía, catéteres permanentes, hospitalización previa). Son necesarias medidas de control ya que los pacientes colonizados y el personal sanitario (y el instrumental) son los mayores reservorios de SARM en el ámbito hospitalario.

B) SARM EN LA COMUNIDAD (SARM-AC)

SARM es una importante causa de infección nosocomial en todo el mundo, pero desde los años 90, la epidemiología de este microorganismo está sufriendo importantes cambios. La emergencia de estas bacterias no es un fenómeno exclusivo del ámbito hospitalario. En 1993, en Australia, en un aborígen de una comunidad aislada se describió por primera vez una infección causada por SARM-AC (Udo *et al.*, 1993). Hoy en día, cada vez son más los trabajos que hacen referencia a infecciones por SARM en pacientes de la comunidad sin contacto previo con el sistema sanitario y sin los factores de riesgo típicos asociados a la infección por este microorganismo (Zaoutis *et al.*, 2006; Lo *et al.*, 2009; Maikogilho *et al.*, 2009). Se trata en su mayoría de infecciones de piel y partes blandas, aunque también pueden causar neumonía necrosante, o bacteriemias. El contagio y diseminación es principalmente por contacto directo y pueden producir pequeños brotes tal y como se han descrito en determinados grupos de población (jugadores de deportes de contacto, soldados, reclusos, tatuados, guarderías) (Deresinski *et al.*, 2005). Los primeros casos fueron esporádicos pero actualmente la prevalencia de estas cepas adquiridas en la comunidad está aumentando.

Son varios los clones que se asocian a infecciones comunitarias y que se han ido diseminando por todo el mundo. En EEUU constituyen una verdadera endemia, donde es el causante de la mayoría de infecciones de piel y partes blandas. Entre los clones predominantes destacan USA400 y en mayor medida USA300 (ST1 y ST8, respectivamente) descrito principalmente en EEUU aunque también se han encontrado casos en países europeos (Faria *et al.*, 2005), en Australia (Nimmo and Coombs, 2008) y en Asia (Shibuya *et al.*, 2008). Otros ST relacionados con SARM-AC son ST8, ST5, ST30, ST80 y ST59, siendo los tres primeros los más habituales en Europa (Manzur *et al.*, 2008; Cercenado *et al.*, 2008; Vandenesch *et al.*, 2003).

Las cepas SARM-AC y las cepas SARM-AH difieren no solamente en su cuadro clínico y en su epidemiología sino que presentan en general características fenotípicas y genéticas distintas. También se diferencian por la secuencia tipo obtenida por MLST y por los patrones de bandas obtenidos por PFGE. Por otra parte, las cepas SARM-AC se asocian con los SCCmec tipo IV, V y VII (Vandenesch *et al.*, 2003; Ellington *et al.*, 2009), que normalmente sólo poseen el

gen *mecA*, algo que concurra, al ser estas cepas generalmente sensibles a la mayoría de antibióticos no β -lactámicos. Sin embargo, existen excepciones, de manera que el clon USA300 (ST8) presenta una resistencia elevada a macrólidos con presencia del gen *msrA* y también es capaz de adquirir los genes *ermA* y *ermC* así como *tetK* y *tetM* siendo resistente a clindamicina y tetraciclina (Tenover and Goering, 2009). Por otro lado, se ha observado como las cepas perteneciente al ST80 presentan en muchas ocasiones el gen *fusB* capaz de proporcionar resistencia al ácido fusídico (Larsen *et al.*, 2008).

Asimismo, se ha observado una estrecha relación entre la presencia de los genes *lukS-PV/lukF-PV* codificantes de la leucocidina de Panton-Valentine (LPV) y las cepas de SARM-AC capaces de producir enfermedades (Vandenesch *et al.*, 2003). Estudios recientes han determinado que existen otras toxinas que pueden contribuir a la virulencia de los SARM-AC, este es el caso de la α - y γ -hemolisina (Smith and Cook, 2005) o de las enterotoxinas b y c (Fey *et al.*, 2003).

En la actualidad se está produciendo un rápido aumento en la prevalencia de SARM-AC en algunos países, principalmente en EEUU y, a menudo, está sustituyendo a las cepas propiamente hospitalarias. De forma que, hoy en día, la barrera entre ambos tipos es cada vez menor. Esto se refleja en que cepas consideradas SARM-AC en ocasiones están presentando resistencias a antibióticos no β -lactámicos no propias de estos clones. Además, se ha visto como a veces presentan SCCmec de tipo I, II o III más propios de ambientes nosocomiales, y pueden no presentar los factores de virulencia propios de estos clones (Jeong *et al.*, 2007; Deresinski *et al.*, 2005).

TABLA 5. DIFERENCIAS ENTRE SARM-AH Y SARM-AC.

	SARM-AC	SARM-AH
SCCmec	IV, V, VII	I, II, III
agr	I, II	III
Virulencia	PVL	No PVL
Susceptibilidad a antibióticos	Perfil de resistencia estrecho. Generalmente sólo resistentes a β-lactámicos	A menudo multirresistentes
Paciente tipo	Niños y jóvenes; atletas y deportistas; personal militar; reclusos; drogadictos	Ancianos, personas debilitadas y/o con infecciones crónicas
Factores de riesgo	deportistas de contacto, reclusos, guarderías, drogadictos, soldados	Inmunodeprimidos, cirugía, catéteres, hospitalización previa
Cuadro clínico	Infección de piel y partes blandas (celulitis, abscesos) en general leves. Situación grave en casos de neumonía necrótica, bacteriemia y shock séptico, infecciones óseas, etc.	Cuadros clínicos graves. A menudo bacteriemia sin foco de infección obvio; úlceras abiertas, heridas quirúrgicas, catéteres urinarios. Puede causar neumonía asociada a ventilación

C) SARM EN ANIMALES

SARM también puede aislarse de animales, ya sea como causante de infecciones o formando parte de la microbiota natural, principalmente en mucosa de fosas nasales de animales portadores asintomáticos.

El primer caso de SARM en animales se describió en vacas con mastitis (Devriese *et al.*, 1972), y desde entonces, se han aislado cepas de SARM en diferentes especies de animales de producción (Voss *et al.*, 2005; Lee, 2003). También se han descrito casos de SARM en animales de compañía, como perros y gatos y en caballos (Leonard and Markey, 2006).

La presencia de este microorganismo en animales desempeña un importante papel en la epidemiología de SARM ya que representan un reservorio natural de SARM y el contacto con los animales puede implicar un riesgo para la salud humana. El riesgo para el hombre de ser colonizado por SARM asociado a animales ha sido identificado recientemente (Lee, 2003; Voss *et al.*, 2005; Weese *et al.*, 2005-b). En relación a la presencia de SARM en animales, es importante distinguir entre los animales de compañía y los animales de producción (Morgan, 2008), son dos situaciones diferentes y las cepas SARM aisladas también presentan características diferentes.

Animales de compañía y caballos

S. aureus causa un amplio rango de infecciones oportunistas en animales de compañía, como infecciones superficiales de piel, infecciones post-operatorias y, en ocasiones también es el causante de importantes patologías.

La aparición de SARM en animales de compañía fue descrita por primera vez en gatos en Brasil en 1998 (Lilenbaum *et al.*, 1998) y desde entonces su presencia en estos animales está aumentando, sobre todo en los últimos años (Leonard and Markey, 2006; Weese *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008; Loeffler *et al.*, 2008). Esto sugiere que SARM se está también convirtiendo en un problema emergente en la práctica veterinaria de animales de compañía (Guardabassi *et al.*, 2004). Los estudios de tipado molecular revelan que la mayoría de las cepas SARM aisladas en estos casos muestran características similares a las cepas aisladas en los humanos (Strommenger *et al.*, 2006; Baptise *et al.*, 2005). No se descarta por lo tanto el posible origen humano de estas cepas, siendo el hombre el que probablemente extienda estos clones en hospitales, en la comunidad, y consecuentemente a los animales de compañía (Walther *et al.*, 2009; van Duijkeren *et al.*, 2004; Weese *et al.*, 2005). Pero paralelamente, estos animales de compañía portadores pueden constituir un reservorio de cepas SARM, pudiendo transferir dichos microorganismos al ser humano, aumentando así la capacidad de diseminación (Walther *et al.*, 2009). Por tanto, los animales de compañía colonizados desempeñan un papel importante, y a veces subestimado, en la epidemiología de SARM en humanos. La prevalencia de colonización por SARM en animales sanos en la comunidad es del 0-1% (Leonard and Markey, 2006;

Weese and van Duijkeren, 2009) alcanzando valores de 9% en animales hospitalizados (Loeffler *et al.*, 2005; (Weese and van Duijkeren, 2009).

No hay muchos datos sobre la dinámica de colonización de SARM a nivel individual, pero parece que la colonización en perros y gatos es transitoria, quizás debido a que *S. aureus* no es un microorganismo predominante en la flora comensal natural de estas especies (Weese and van Duijkeren, 2009). No obstante, se han descrito casos de perros con cepas productoras de la Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) (Rankin *et al.*, 2005), lo que agrava la infección tanto en dichos animales como en los posibles casos humanos o animales en contacto con estos.

También se han aislado cepas SARM en caballos. Al igual que ocurre en animales de compañía, la mayoría de los casos clínicos corresponden a infecciones y heridas de piel e infecciones post-operatorias, aunque también pueden causar patologías de distinta gravedad como neumonía, bacteriemia u osteomielitis, entre otros. La primera vez que se detectó SARM en caballos fue en 1996, en una yegua con metritis (Anzai *et al.*, 1996). Desde entonces se han aislado cepas SARM en numerosos casos en diferentes países, tanto colonizando (Van de Eede *et al.*, 2009) como causando infecciones (Leonard and Markey, 2006; Loeffler *et al.*, 2009; Weese and van Duijkeren, 2009).

Estudios moleculares de cepas SARM aisladas de muestras de caballo y del personal en contacto con estos animales muestran que difieren de las cepas que normalmente comparten perros, gatos y los humanos asociados a éstos, así como de las variantes que causan infección en humanos (Baptiste *et al.*, 2005; Leonard and Markey, 2006). Esto sugiere que los clones que circulan en caballos, a diferencia de lo que ocurre en animales domésticos, son diferentes a los clones humanos, y que el contacto prolongado con éstos tiene el consiguiente riesgo de colonización por tales variantes (Weese *et al.*, 2005-b; Weese *et al.*, 2006).

La prevalencia de colonización por SARM en caballos a nivel comunitario es variable, con tasas del 0-10,9% (Leonard and Markey, 2006; Weese and van Duijkeren, 2009). Cabe destacar que se aprecia un aumento en los últimos años habiéndose descrito cuartas con una prevalencia de hasta el 43% (Weese and Rousseau, 2005). El porcentaje aumenta cuando se trata de animales con infección (Leonard and Markey, 2006; Weese and van Duijkeren, 2009). Al igual que ocurre en perros y gatos, la colonización por SARM en los caballos parece ser transitoria en la mayoría de los casos, ocurriendo descolonizaciones naturales si se previene la reinfección (Weese and Rousseau, 2005). Es importante señalar, sin embargo, que SARM parece ser un microorganismo ya endémico en la población equina en muchas regiones.

Animales de producción. Aparición de SARM ST398

El primer caso de SARM de fuente no-humana se detectó en una muestra de leche de una vaca con mastitis (Devriese *et al.*, 1972). Aunque la prevalencia en ganado vacuno es baja (Lee, 2003), este microorganismo puede causar serias infecciones en estos animales, principalmente mastitis (Kwon *et al.*, 2005; Holden

et al., 2009). SARM se ha aislado también en animales enfermos o sanos de otras especies de animales de producción como cerdos (Voss *et al.*, 2005), y en menor medida en pollos (Lee, 2003; Nemati *et al.*, 2009), ovejas y conejos (Leonard and Markey, 2006).-Los estudios de tipado molecular parecen demostrar que las líneas genéticas de cepas SARM aisladas de cerdos, así como las aisladas de vacas, difieren con respecto a aquellas encontradas en humanos (Van Loo *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2005).

En los últimos años está emergiendo en diferentes países de todo el mundo una nueva variante de SARM de la secuencia tipo ST398, asociada a animales de producción. SARM ST398 se describió por primera vez en cerdos en Holanda en 2005 (Voss *et al.*, 2005) y desde entonces ha habido un continuo aumento en el número de casos descritos en estos animales en varios países europeos (Witte *et al.*, 2007; de Neeling *et al.*, 2007; Pomba *et al.*, 2009; Hanna *et al.*, 2007; Gómez-Sanz *et al.*, 2009), en Canadá (Khanna *et al.*, 2007), en Estados Unidos (Smith *et al.*, 2009), en Singapur (Sergio *et al.*, 2007) y más recientemente en China (Cui *et al.*, 2009) y en Perú (Arriola *et al.*, 2009). Los porcentajes de colonización son muy variables en los diferentes estudios, oscilando entre 6-80% (Weese and van Duijkeren, 2009).

El principal reservorio de la variante ST398 es el cerdo (Huijsdens *et al.*, 2009; Wulf and Voss, 2008), aunque no se conocen los determinantes específicos que los diferentes linajes de SARM pueden tener para estar adaptados a diferentes especies (EFSA, 2009). El origen de ST398 no está muy claro, pero se cree que el uso excesivo de determinados antibióticos (cefalosporinas, tetraciclinas,...) podría explicar su aparición y diseminación (Hanna *et al.*, 2007). Hay que tener en cuenta que una característica de las cepas SARM ST398 es su resistencia casi constante a la tetraciclina, además de a los beta-lactámicos.

Al igual que SARM de otras líneas genéticas, SARM ST398 se encuentra principalmente en las fosas nasales y otras mucosas de los animales colonizados. Aunque ST398 es la variante genética de SARM más asociada con portadores asintomáticos en animales de producción, y en especial en cerdos, también se ha aislado como agente etiológico de infecciones en estos animales (Armand-Lefevre *et al.*, 2005; Van Duijkeren *et al.*, 2007; Sergio *et al.*, 2007). SARM ST398 también ha sido detectado en otros animales como aves de corral, vacas y terneros con mastitis (Nemati *et al.*, 2008; Graveland *et al.*, 2008; Monecke *et al.*, 2007).

Conviene destacar que aunque la mayor parte de las cepas ST398 descritas hasta la fecha son LPV-negativas, se han descrito casos de cepas ST398 LPV-positivas en cerdos en Asia y en Europa (Yu *et al.*, 2008; Welinder-Olsson *et al.*, 2008) y en un caso en ganado vacuno en Korea (Kwon *et al.*, 2005).

SARM ST398 en animales de compañía y équidos

Dada la demostrada transmisión inter-especies de SARM, no es de extrañar que este clon apareciera también en otras especies animales no relacionadas con las de producción animal. En este sentido, SARM ST398 también se ha aislado, aunque esporádicamente, en animales de compañía, dándose el primer caso en

Austria en 2007 (Nienhoff *et al.*, 2009; Witte *et al.*, 2007). Estas cepas ST398 podrían provenir directamente de los animales de producción, cuando se trata de animales de compañía que viven en las granjas. También se piensa que la presencia de estas cepas SARM puede ser debido a una transmisión de los humanos a los animales de compañía. En cualquier caso, los animales de producción serían el principal reservorio transmitiendo dichas cepas a los animales de compañía o a los humanos y éstos posteriormente a los animales de compañía, lo que demuestra la facilidad de transmisión y adaptabilidad de esta nueva variante genética.

En caballos se han dado numerosos casos de SARM ST398 tanto en portadores asintomáticos (Van den Eede *et al.*, 2008) como en muestras clínicas (Cuny *et al.*, 2008; Loeffler *et al.*, 2009; Leonard and Markey, 2006). Aunque se cree que el reservorio principal de ST398 es el cerdo, la prevalencia es también alta en caballos. En este sentido, los caballos parecen ser también un importante reservorio de SARM ST398, y hay que tener en cuenta que en muchos países la cría de caballos es muy elevada y además, existe un mayor contacto directo de éstos animales con las personas, en comparación con los animales de producción, lo que puede facilitar la diseminación de SARM.

EMERGENCIA DE CEPAS SARM ST398 Y TRANSFERENCIA A HUMANOS

Dada la elevada prevalencia de SARM ST398 en cerdos, era de esperar que personas en contacto directo con estos animales (especialmente granjeros, trabajadores de matadero y veterinarios) tuvieran un mayor riesgo de colonización y, consecuentemente, de infección (Huijsdens *et al.*, 2006; Armand-Lefevre *et al.*, 2005; Hanna *et al.*, 2007). De hecho, un estudio llevado a cabo en Holanda en 2005 estimó que la prevalencia de portadores asintomáticos de SARM en granjeros de cerdos era 760 veces superior que en la población sin contacto con estos animales (Voss *et al.*, 2005). También se ha observado una elevada prevalencia de portadores nasales asintomáticos entre los familiares de los granjeros (Khanna *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2005; Huijsdens *et al.*, 2006; Aspiroz *et al.*, 2009-a; Aspiroz *et al.*, 2010) y, como acabamos de describir (aunque ocasionalmente) en los animales de compañía cercanos a la granja.

En el año 2005 se detectó por primera vez esta variante en humanos, en un granjero sano en Francia (Armand-Lefevre *et al.*, 2005). Ese mismo año, en Holanda, se aisló ST398 como agente causante de una infección en la hija de un granjero (Voss *et al.*, 2005). De este modo, SARM ST398 se puede encontrar en humanos tanto como agente colonizador como patógeno. Aunque no es común, son varios los casos de infecciones en humanos debidas a esta variante genética que han sido descritos en algunos países europeos (Wulf and Voss, 2008; Witte *et al.*, 2007; Krziwanek *et al.*, 2009; Aspiroz *et al.*, 2009-b; Aspiroz *et al.*, 2010). Se trata de infecciones de piel y tejidos blandos en su mayoría y, ocasionalmente, infecciones invasivas (Wulf and Voss, 2008; Pan *et al.*, 2009; Krziwanek *et al.*, 2009). Se ha identificado, por tanto, que el contacto con estos animales constituye

un factor de riesgo para la colonización por SARM en humanos con su consiguiente peligro de infección y/o diseminación (Guardabassi *et al.*, 2007).

Esta variante genética también se ha aislado en personal veterinario que había tenido contacto directo o indirecto con caballos (Weese *et al.*, 2005-b; Cuny *et al.*, 2008; Hanselman *et al.*, 2006; Weese *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito la colonización por SARM ST398 en granjeros de ganado vacuno, lo cual parece indicar el origen animal de este tipo de colonización (Graveland *et al.*, 2008). Diversos autores han analizado la eficacia de llevar a cabo una descolonización nasal en individuos sanos portadores de SARM ST398 y con un contacto intenso con animales vivos colonizados por ST398, demostrándose una baja eficacia ya que dichos individuos sufrían una rápida recolonización nasal por ST398 (Aspiroz *et al.*, 2009-a).

Hay que destacar que en algunos casos muy aislados se ha detectado colonización nasal por ST398 en personas sin contacto estrecho con animales no conociéndose en este caso la fuente de la contaminación (Krziwanek *et al.*, 2009).

DETECCIÓN DE SARM EN ALIMENTOS

S. aureus es conocida por estar implicada en intoxicaciones alimentarias. En estos casos no es la bacteria sino las enterotoxinas producidas por la misma las responsables de la intoxicación. Existen diferentes tipos de enterotoxinas que están codificadas por los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sef*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, *seq* y *seu* (Chiang *et al.*, 2008).

Las cepas *S. aureus* presentes en los alimentos pueden tener un origen humano o animal, de forma que el alimento puede contaminarse al ser procesado por manipuladores colonizados o bien el microorganismo puede estar presente en la materia prima. De ahí que los alimentos donde es más probable encontrar este microorganismo son aquellos que requieren gran elaboración "productos preparados" o aquellos que tienen un origen animal, es decir, productos cármicos o lácteos. Los alimentos más frecuentemente relacionados con intoxicaciones por *S. aureus* son productos derivados de aves, carnes poco cocinadas o crudas, o productos de pastelería.

En la actualidad no existen muchos estudios sobre la detección de SARM en alimentos ya que la presencia de este microorganismo no se investiga de manera rutinaria. Los alimentos más estudiados son productos lácteos y productos cármicos crudos. En el primer caso la tasa encontrada va del 0.18% (Kwon *et al.*, 2005) hallada en Corea al 10.4% (Farzana *et al.*, 2004) detectada en Pakistán. En las investigaciones llevadas a cabo en productos cármicos los resultados son similares con tasas de contaminación que van desde la no detección de SARM (Kaszanyitzky *et al.*, 2003) o porcentajes de detección muy bajos 0.18% (Kwon *et al.*, 2005), 0.45% (Kitai *et al.*, 2005), 1.1% (Kerouanton *et al.*, 2007), 1.6% (Lozano *et al.*, 2009) a valores más elevados 2.5 % (van Loo *et al.*, 2007), 5 % (Pu *et al.*, 2009) y 11.9 % (de Boer *et al.*, 2009). La diferente metodología aplicada y el diferente tipo y número de muestras podrían influir en parte en las diferencias detectadas en estos estudios.

El tipado molecular es una importante herramienta para conocer el origen de las cepas SARM encontradas en los alimentos. De esta forma se han hallado cepas con líneas genéticas asociadas a infecciones en humanos tanto del tipo SARM-AH (Lozano *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2009) como SARM-AC (Kwon *et al.*, 2005; Pu *et al.*, 2009) donde las cepas resultaron además portadoras de los genes *lukS-PV/lukF-PV*. Por otra parte, también se han detectado cepas SARM de la nueva variante ST398, asociada con animales, en dos estudios llevados a cabo en Holanda (van Loo *et al.*, 2007; Boer *et al.*, 2009) y en un estudio realizado en España (Lozano *et al.*, 2009).

Por tanto, en la actualidad, es difícil determinar el riesgo derivado de la presencia de SARM en diferentes tipos de alimentos debido a la gran variedad de métodos utilizados y a la escasez de estudios existentes. Lo que sí podemos afirmar es que la cadena alimentaria puede ser un vehículo de cepas SARM. Según las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, parece que el riesgo de transmisión de SARM a humanos a través de los alimentos podría ser bajo, teniendo en cuenta que en la mayor parte de los estudios se detecta bajo nivel de contaminación por SARM en los alimentos, aunque no se puede descartar el peligro que su presencia en productos lácteos y cárnicos conlleva. Muestra de ello es que existen dos brotes descritos de intoxicaciones alimentarias causadas por SARM (Kluytmans *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2002). Además, los alimentos contaminados por SARM constituyen un riesgo no sólo para los consumidores sino también para el personal encargado de su manipulación. De ahí la necesidad de tomar medidas de protección y medidas higiénicas adecuadas como el uso de guantes, gorros y mascarillas.

Existen diferentes procedimientos con los que podemos reducir la posible presencia de *S. aureus* en los alimentos. No hay que olvidar que se trata de un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales, y extremadamente difícil de erradicar. Soporta bien las condiciones extremas aunque se inactiva a temperaturas inferiores a 0°C y puede eliminarse con una cocción correcta. Gracias a una correcta refrigeración, además, podemos evitar que la bacteria produzca las toxinas que desencadenan la toxiinfección.

Como resumen podemos decir que SARM es un patógeno de gran importancia en nuestros hospitales causante de múltiples brotes nosocomiales. Sin embargo, en los últimos años se está produciendo la emergencia de nuevas características epidemiológicas de este patógeno, como es la detección de variantes que se diseminan en el ámbito comunitario y la emergencia de la variante ST398 asociada a animales y que se trasfiere a personas en contacto con ellos. La nueva dimensión que está surgiendo entorno a SARM hace necesario la creación de grupos de trabajo interdisciplinares (que incluyan científicos y profesionales de la sanidad humana y animal) que estudien en profundidad los factores que están contribuyendo a la emergencia de las nuevas variantes y a su diseminación en diferentes ámbitos.

AGRADECIMIENTOS

Carmen Lozano tiene una beca FPU del Ministerio de Ciencia e Innovación de España; Elena Gómez-Sanz tiene una beca FPI del Gobierno de la Rioja de España.

REFERENCIAS

- Anzai T., Kamada M., Kanemaru T., Sugita S., Shimizu A., Higuchi T. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from mares with metritis and its zoopidemiology. *Journal of Equine Science*. 1996; 7:7-11.
- Armand-Lefevre L., Ruimy R., Andreumont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis*. 2005; 7:11-4.
- Arriola C.S., Angelats R., Changanaqui C., Güere M., González A., Gilman R., Moulton L., Silberfeld E. Recovering methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs in large-scale farming in Lima, Perú using non-selective and selective methods. *ASM and ESCMID on: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: Veterinary and Public Health Implications*. 2009. London, England.
- Aspiroz C., Lozano C., Lasarte J., Zarazaga M., Torres C. Dinamic of MRSA ST398 nasal colonization after mupirocin treatment in a pig-associated family previously colonized by MRSA ST398, in Spain. *ASM and ESCMID on: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: Veterinary and Public Health Implications*. 2009. a. London, England.
- Aspiroz C., Lozano C., Ara M., Zarazaga M., Toledo M., Gilaberte Y., Torres C. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ST398-SCCmecVat011 sobreinfectando lesiones de psoriasis en un paciente relacionado profesionalmente con el ganado porcino. XIII Reunión SEIMC. 2009-b. Sevilla, Spain.
- Aspiroz C., Lozano C., Vindel A., Lasarte J., Zarazaga M., Torres C. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:157-9.
- Bannoehr J., Ben Zakour N.L., Waller A.S., Guardabassi L., Thoday K.L., van den Broek A.H., Fitzgerald J.R. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol*. 2007; 189:8685-92.
- Banwart G.J. Microbiología básica de los alimentos. Ediciones bellaterra. 1982.
- Bapiste K.E., Williams K., Williams N.J., Wattrat A., Clegg P.D., Dawson S., Corkill J.E., O'Neill T., Hart CA. Methicillin-resistant *Staphylococci* in companion animals. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11:1942-4.
- Bosch T., de Neeling A.J., van der Zwaluw K.W., Schouls L.M., Grundmann H., Huijsdens X.W. PFGE variation within the Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 clonal lineage using restriction enzyme *Cfr91*. *ASM and ESCMID on: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: Veterinary and Public Health Implications*. 2009. London, England.
- Brakstad O.G., Savac K., Maeland J., "Detection *Stahylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the *nuc* Gene", *J Clin Microbiol*. 1992; 30:1654-60.

- Broseña A., Chaves F., Rojo P., Otero J.R. Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24:31-5.
- Bubeck-Wardenburg J., Bae T., Otto M., DeLeo F.R., Schneewind O. Poring over pores: a hemolysin and Pantón-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nature Medicine.* 2007; 13:1405-6.
- Cercenado E., Cuevas O., Marín M., Bouza E., Trincado P., Boquete T., Padilla B., Vindel A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Pantón-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61:143-9.
- Chiang Y.C., Liao W.W., Fan C.M., Pai W.Y., Chiou C.S., Tsen H.Y. PCR detection of *Staphylococcal enterotoxins* (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int J Food Microbiol.* 2008; 121:66-73.
- 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; 64:680-3.
- 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; 14:307-10.
- de Boer E., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., Wit B., Huijsdens X.W., de Neeling A.J., Bosch T., van Oosterom R.A., Vila A., Heuvelink A.E. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol.* 2009; 134: 52-6.
- de Neeling A.J., van den Broek M.J., Spalburg E.C., van Santen-Verheulvel M.G., Dam-deisz W.D., Bosthuizen H.C., van de Giessen A.W., van Duijkeren E., Huijsdens X.W. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol.* 2007; 122:366-72.
- Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:562-73.
- Deurenberg R.H., Stobberingh E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 2008; 8:747-63.
- Devriese L.A., Van Damme L.R., Fameree L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl Bacteriol.* 1972; 19:598-605.
- Doebbeling B.N., Breneman D.L., Neu H.C., Aly R., Yangco B.G., Holley H.P., Marsh R.J., Praller M.A., McGowan J.E., Scully B.E., Reagan D.R., Wenzel R.P. Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. The Mupirocin Collaborative Study Group. *Clin Infect Dis.* 1993; 17:466-74.
- Domínguez M.A., Coll P., Coque T., Vazquez J., Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: Cantón R, Cercenado E (EDS). *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC.* 2005
- Elements (IWG-SCC). Classification of *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:496-17.
- Ellington M.J., Perry C., Ganner M., Warner M., McCormick Smith I., Hill R.L., Shallcross L., Sabersheikh S., Holmes A., Cookson B.D., Kearns A.M. Clinical and molecular epidemiology of ciprofloxacin-susceptible MRSA encoding PVL in England and Wales. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009. In press.
- Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1008-15.
- European Food Safety Authority (EFSA). *Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods.* The EFSA Journal. 2009; 993, 1-73.
- Faria N.A., Oliveira D.C., Westh H., Monnet D.L., Larsen A.R., 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; 43:1836-42.
- Farzana K., Shah S., Jabeen F. Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. *Journal of Research (Science).* 2004; 15:145-51.
- Fey P.D., Said-Salim B., Rupp M. E., Hinrichs S.H., Boxrud D.J., Davis C.C. Kreiswirth B.N., Schlievert P.M. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:196-203.
- Frénay H.M., Bunschoten A.E., Schouls L.M., van Leeuwen W.J., Vandembroucke-Grauls C.M., Verhoef J., Mooi F.R. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15:60-4.
- Gómez-Sanz E., Lozano C., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Torres C. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) type ST398 in adult swine and piglets at slaughter in Spain. *ASM and ESCMID on: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: Veterinary and Public Health Implications.* 2009. London, England.
- Gordon R.J., Lowy F.D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:350-9.
- Graveland H., Wagenaar J.A., Broekhuizen-Stiis M.J., Oosting-Schothorst I., Schoormans A., Van Duijkeren E., Huijsdens X., Mevius D., Heederik D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veal calf farmers and veal calves in The Netherlands. *ASM on: Antimicrobial Resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens.* 2008. Copenhagen, Denmark.
- Gross-Schulman S., Dassey D., Mascola L., Anaya C. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA.* 1998; 280:421-2.
- Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet.* 2007; 368:874-85.
- Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *The Lancet.* 2006; 368:874-85.
- Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54:321-32.
- Hanselman B.A., Kruth S.A., Rousseau J., Low D.E., Willey B.M., McGeer A., Weese J.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:1933-8.
- 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; 41:5442-8.
- Higuchi W., Teng L.J., Yamamoto T. Structure and specific detection of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type VII. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 377:752-6.
- Hiramatsu K., Ito T., Hanaki H. Mechanisms of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Baillière's Clin Infect Dis. 1999; 5:221-42.
- Holden T.M., Garcia-Alvarez L., Brooks K., Brown F.D., Maskell D.J., Webb C.R., Holmes M.A., Bentley S. D. The complete genome sequence of a bovine associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. ASM and ESCMID on: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in animals: *Veterinary and Public Health Implications*. 2009. London, England.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:4961-7.
- 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; 45:1323-36.
- Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. Novel type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:2637-51.
- Jeong H.Y., Lee J.E., Seo K.W., Park S.H., Kim Y.L., Baek K.M., Lee K., Rhee D.K. Molecular epidemiology of community-associated antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* in Seoul, Korea (2003): pervasiveness of multidrug-resistant SCC*mec* type II methicillin-resistant *S. aureus*. Microb Drug Resist. 2007; 13:178-85.
- Jevons M.P. 1961. Celbenine-resistant Staphylococci. BMJ. 1, 124-125.
- Jones T.F., Kellum M.E., Porter S.S., Bell M., Schaffner W. An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2002; 8:824.
- Kaszanyitzky E.J., Janosi S., Egedy Z., Agost G., Semjen G. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. Acta Vet Hung. 2003; 51:451-64.
- Kerouanton A., Hennekinne J.A., Leterre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyer M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. Int J Food Microbiol. 2007; 115:369-75.
- Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J.S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol. 2008; 128:298-303.
- Krzywanek K., Metz-Gercek S., Mittermayer H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria. Emerg Infect Dis. 2009; 15:766-9.
- 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; 67:107-10.
- Antibióticos: uso, mecanismos de acción, de resistencia y antibiograma
- Kluytmans J., van Leeuwen W., Goessens W., Hollis R., Messer S., Herwaldt, 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; 33:1121-8.
- Kwon N.H., Park K.T., Moon J.S., Jung W.K., Kim S.H., Kim J.M., Hong S.K., Koo H.C., Joo Y.S., Park Y.H. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:624-32.
- Larsen A.R., Böcher S., Stegger M., Goering R., Pallesen L.V., Skov R. Epidemiology of European Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 80 Type IV Strains Isolated in Denmark from 1993 to 2004. J Clin Microbiol. 2008; 46:62-8.
- Lee J.H. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:6489-94.
- Leonard F.C., Markey B.K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. The veterinary journal. 2008; 175:27-36.
- Lewis H.C., Molbak M., Reese C., Aarestrup F.M., Seichau M., Sorum M., Skov R.L. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in Humans, Denmark. Emerg Infect Dis. 2008; 14:1383-9
- Lilenbaum W., Nunes E.L., Azeredo M.A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. Lett Appl Microbiol. 1998; 27:224-8.
- Lo W.T., Tang C.S., Chen S.J., Huang C.F., Tseng M.H., Wang C.C. 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.
- Loeffler A., Boag A.K., Sung J., Lindsay J.A., Guardabassi L., Dalsgaard A., Smith H., Stevens K.B., Lloyd D.H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:692-7.
- Lozano C., López M., Gómez-Sanz E., Ruiz-Larrea F., Torres C. and Zarazaga M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type ST398 in food samples of animal origin in Spain. J Antimicrob Chemother. 2009; 64:1325-6
- Ma X.X., Ito T., Tiensasitorn C., Jankiang M., Chongtrakool P., Boyle-Yavira S., Daum R.S., Hiramatsu K. Novel type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* identified in community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:1147-52.
- Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci. 1998; 95:3140-5.
- Makgotho P.E., Kock M.M., Hoosen A., Lekakala R., Omar S., Dove M., Ehlers M.M. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 57:104-15.
- Malachowa N., Sabat A., Gniadkowski M., Krzyszton-Russjan J., Ermpel J., Miedzobrodzki J., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C., Hryniewicz W. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis.

- spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:3095-100.
- Manzur A., Dominguez A.M., Pujol M., González M.P., Limon E., Homero A., Martín R., Gudiol F., Ariza J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:377-80.
- McDougal L.K. and Thomsberry C. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol.* 1986; 23:832-9.
- Miller M.A., 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; 17:811-3.
- Monecke S., Kuhnert P., Holzel H., Slickers P., Ehrlich R. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol.* 2007; 125:128-40.
- Moodley A., Stegger M., Ben Zakour N.L., Fitzgerald J.R., Guardabassi L. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (spa) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Microbiol.* 2009; 135:320-6.
- Morgan M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62:1181-7.
- Murchan S., Kaufmann M.E., Deplano A., de Ryck R., Struelens M., Zinn C.E., Fussing V., Salmelinna S., Vuopio-Varkila J., El Solh N., Cuny C., Witte W., Tassios P.T., Legakis N., van Leeuwen W., van Belkum A., Vindel A., Laconcha I., Garaizar J., Haeghebaert S., Olsson-Liljequist B., Ransjö 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; 41:1574-85.
- Nemati M., Hermans K., Lipinska U., Denis O., Deplano A., Struelens M., Devriese L.A., 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; 52:3817-9.
- Nimmo G.R., Coombs G.W. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31:401-10.
- Olivera D.C., Milheiric C., Lencastre H. Redefining a structural variant of *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*, *SCCmec* Type VI. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:3457-9.
- Olivera D.C., 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; 2:180-9.
- Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A., Giorgi M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martinotti M., Monaco M., Pantostiet A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:845-7.
- Pomba C., Hasman H., Cavaco L.M., da Fonseca J.D., Aarestrup F.M. First description of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34:193-4.
- Pu S., Han F., Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75:265-7.
- Rankin S., Roberts S., O'Shea K., Maloney D., Lorenzo M., Benson C.E. Panton valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *J Vet Med Sci.* 1997; 59:935-7.
- 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; 47:3313-22.
- Ruiz de Gopegui E., Oliver A., Herrero J., Pérez J.L. Nosocomial pneumonia due to community-acquired methicillin-resistant Pantón-Valentine-leukocidin-producing *Staphylococcus aureus*. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2008; 26:533-4.
- Sergio D.M., Koh T.H., Hsu L.Y., Ogden B.E., Goh A.L., Chow P.K. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol.* 2007; 56:1107-9.
- Shibuya Y., Hara M., Higuchi W. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Japan. *J Infect Chemother.* 2008; 14:439-41.
- Shopsin B., Gómez M., Waddington M., Riehmman M., Kreiswirth B.N. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3453-6.
- Shopsin B., Mathema B., Alcabes P., Said-Salim B., Lina G., Matsuka A., Martinez J., Kreiswirth B.N. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:456-9.
- Skov R., Li S., Ito T., Rhod Larsen A., Sorum M., Wulf M., Voss A., Xiao H., Hiramatsu K. Identification of two novel SCCmec elements carried by MRSA CC398 strains isolated from veterinarians. *ASM and ESCMID on: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: Veterinary and Public Health Implications.* 2009. London, England.
- Smith J.M., Cook G.M. A decade of community MRSA in New Zealand. *Epidemiol Infect.* 2005; 133:899-904.
- Smith T.C., Male M.J., Harper A.L., Kroeger J.S., Tinkler G.P., Moritz E.D., Capuano A.W., Herwaldt L.A., Diekema D.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One.* 2008; 4:e4258.
- Stewart G.T., Holt R.J. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *Br Med J.* 1963; 5326:308-11.
- Strommenger B., Kehrenberg C., Kettlitz C., Cuny C., Verspohl J., Witte W., Schwarz S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57:461-5.
- Struelens M.J., Hawkey P.M., French G.L., Witte W., Tacconelli E. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15:112-9.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-9.
- Tenover F.C., Goering R.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:441-6.

- Thomas J.C., Varga M.R., Miragaia M., Peacock S.J., Archer G.L., Enright M.C. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:616-9.
- Traber K.E., Lee E., Benson S., Corrigan R., Cantera M., Shopsin B., Novick R.P. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology.* 2008; 154:2265-74.
- Udo E.E., Pearman J.W., Grubb W.B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect.* 1993; 25:97-108.
- 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; 133:138-44.
- van Duijkeren E., Jansen M.D., Flemming S.C., de Neeling H., Wagenaar J.A., Schoormans A.H., van Nes A., Fluit A.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1408-10.
- van Duijkeren E., Wolfhagen M.J., Box A.T., Heck M.E., Wannet W.J., Fluit A.C. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:2235-7.
- van Loo I.H.M., Diederik B.M.W., Savelkoul P.H.M., Woudenberg J.H.C., Roosendaal R., van Belkum A., Lemmens-den Toom N., Verhulst C., van Keulen P.H., Kluytmans J.A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Meat Products, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1753-5.
- Vandenesch F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G.R., Heffernan H., Liassine N., Bes M., Greenland T., Reverdij M.E., Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:978-84.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1965-6.
- Walther B., Wieler L.H., Friedrich A.W., Hanssen A.M., Kohn B., Brunenberg L., Lübke-Becker A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Vet Microbiol.* 2008; 127:171-8.
- Walther B., Wieler L.H., Friedrich A.W., Kohn B., Brunenberg L., Lübke-Becker A. *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization rates among personnel and dogs in a small animal hospital: association with nosocomial infections. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2009; 122:178-85.
- Weese J.S., Caldwell F., Willey B.M., Kreiswirth B.N., McGeer A., Rousseau J., Low D.E. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. 2006; 114:160-4.
- Weese J.S., Rousseau J. Attempted eradication of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in horses on two farms. *Equine Vet J.* 2005; 37:510-4.
- Weese J.S., Rousseau J., Traub-Dargatz J.L., Willey B.M., McGeer A.J., Low D.E. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2005-b; 226:580-3.
- Weese J.S., van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2009. doi:10.1016/j.veimic.2009.01.039.
- Wellinder-Olsson C., Florén-Johansson K., Larsson L., Öberg S., Karlsson L., Åhrén C. Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1271-2.
- Witte W., Strommenger B., Stanek C., Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:255-8.
- Wright J.S. 3rd, Traber K.E., Corrigan R., Benson S.A., Musser J.M., Novick R.P. The *agr* radiation: an early event in the evolution of staphylococci. *J Bacteriol.* 2005; 187:5585-94.
- Wu S.W., 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 Bacteriol.* 2001; 183:2417-24.
- Wulf M., Voss A. MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen?. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:519-21.
- Yu F., Chen Z., Liu C., Zhang X., Lin X., Chi S., Zhou T., Chen Z., Chen X. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:381-4.
- Zaoutis T.E., Toltzis P., Chu J., Abrams T., Dul M., Kim J., McGowan K.L., Coffin S.E. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001-2003. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25:343-8.
- Zhang H.Z., Hackbarth C.J., Chansky K.M., Chambers H.F. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science.* 2001; 291:1962-5.
- Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Conly J.M. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type carrying class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:531-40.
- Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Conly J.M. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:531-40.

ANEXO 2: ARTÍCULO SOMETIDO



Evolution in genetic lineages, resistance and virulence in clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* of a Spanish hospital

Carmen Lozano,^a Nerea Porres-Osante,^{a,b} Julien Crettaz,^c Beatriz Rojo-Bezarez,^b Inés Olarte,^c Myriam Zarazaga,^a Yolanda Sáenz,^b Carmen Torres^{a,b}

^aArea Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

^bArea Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, Logroño, Spain

^cLaboratorio de Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received May 2012

Accepted XX 2012

Keywords:

MRSA
Spanish hospital
CC5-t067
CC8
PVL
TSST

ABSTRACT

A total of 204 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains was isolated in a Spanish Hospital in two different periods (2001, 2009). Percentages of MRSA detected in 2001 and 2009 were in the range 27-29%. Genetic lineages, resistance mechanisms, and virulence traits were determined in these isolates. The most frequent detected lineage in both periods was *spa*-type t067, assigned to clonal complex CC5 (CC5-t067), being more prevalent in 2001 (93%) than in 2009 (71%). The remaining CCs and *spa*-types detected were (%2001/%2009): CC5-t002 (0/5), CC8-t008 (1/16), CC8-t024 (0/1), CC8-t190 (0/3), CC8-t2849 (0/2), CC22-t032 (0/2), CC30-t012 (1/0), CC228-t109 (1/0), CC228-t1318 (2/0), and CC247-t051 (2/0). Most of MRSA were isolated from wound, representing 39% in 2001 and 63% in 2009. An emergence of MRSA CC8 strains, mainly from wounds, seems to occur in the second period. Resistance to (%2001/%2009) quinolones (99/87), aminoglycosides (98/88), macrolides (32/30), lincosamides (30/17) and tetracycline (2/1) was found in isolates of both periods. Trimethoprim-sulfamethoxazole resistance was only detected in 2001 (1%), and chloramphenicol (1%) and mupirocin resistance (11%) in 2009. An association between staphylococcal enterotoxins gene profiles and CCs was detected in most of the cases. *egc*-cluster was related to CC5, CC22, CC30, and most of CC8 isolates presented the *sed*, *sej*, and *ser* genes. Four Toxic-Shock-Syndrome-Toxin-positive (CC5 and CC30) isolates were detected in 2001 and two Panton-Valentine-Leukocidin-positive in 2009. Therefore, there is still a predominance of CC5-t067 in our country although an increase of lineage CC8 is observed.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is an important opportunistic pathogen and is frequently associated with nosocomial and community acquired infections which is able to develop resistance to multiple antimicrobial agents. This microorganism produces a large amount of virulence factors that allow host colonization, invasion of tissues, bacterial growth, and evasion of host defense mechanisms. Some of these toxins can be classified in leukocidins [as Pantone-Valentine Leukocidin (PVL)], PTSAGs (Pyrogenic

toxin superantigens), haemolysins or exfoliatins (Jarraud et al., 2002).

In 1961, an important public health problem arose when the first methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strain emerged. The *mecA* gene, which encodes a modified protein with low affinity to beta-lactams (PBP2a), confers resistance to methicillin but also to most of other beta-lactams that leads to a serious therapeutic problem. Additionally, studies carried out in methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and MRSA have shown higher diversity of clonal lineages among MSSA in relation to

MRSA. Thus, according to the obtained results with different molecular typing methods, it has been observed that some MRSA clones tend to occur more in certain countries or areas (Deurenberg and Stobberingh, 2008; Grundmann et al., 2010) while other clones are worldwide disseminated threatening public health (Stefani et al., 2012). These typing methods allow us to know more about the epidemiology, evolution, and spread of this microorganism.

A differentiation between hospital-acquired (HA) and community-acquired (CA) MRSA was initially proposed. However, these distinctions have diminished and today it is often difficult to distinguish them. Recent studies have further shown that some HA-MRSA clonal lineages have been superseded by CA-MRSA clones (Stefani et al., 2012). In addition, new associated lineages with farm animals, known as livestock-associated (LA) MRSA, have also been found in healthcare settings (Wulf et al., 2008). Several surveillance studies have been conducted in European countries to know the predominant MRSA clones. So far, the obtained data in Spain indicate that, while the Iberian clone (CC247-ST247-SCC*mecI-agrI*) was the dominant one in our country in 90's, a derived clone from pediatric origin (CC5-ST125-SCC*mecIV-agrII*) is being the most commonly found in the 21st century (Argudín et al., 2009; Gasch et al., 2011; Pérez-Roth et al., 2004; Pérez-Vázquez et al., 2009). The aim of our study was to identify circulating MRSA clones in a Spanish Hospital, and to know their evolution studying two periods distant in time. Besides the genetic lineage diversity, antibiotic resistance mechanisms and virulence traits were also analyzed to understand the evolution of MRSA in our country.

2. Materials and methods

Selection of the isolates

A total of 204 MRSA isolates were included in this study. These isolates were recovered from unrelated patients in San Pedro Hospital of La Rioja (Northern Spain) in two different periods. One hundred and three of these isolates were obtained from January to June 2001, and the remaining 101 from January to April 2009. The criterion of choice was to study approximately the first 100 MRSA isolates of each year. In the first period, 29% of the obtained *S. aureus* were MRSA and 27% in the second period. The collection included isolates from different origins such as wound, nasal, urine, sputum, blood, bronchial and tracheal aspirate, abdominal and pleural fluid, ear, and catheter.

Confirmation of species and *mecA* gene detection

All MRSA isolates were typed by the Microscan system in the hospital and were subsequently confirmed by a specific duplex PCR of the *nuc* gene (*S. aureus* thermonuclease gene) and the *mecA* gene (methicillin-resistance gene) (Lozano et al., 2011).

Molecular typing

All MRSA isolates were studied by different molecular methods. Single-locus DNA sequencing of *S. aureus* protein A (*spa*) (Harmsen et al., 2003) was carried out following standard methodology and obtained sequences were analyzed by Ridom Staph-Type software version 1.5.21 (Ridom GmbH). Determination of *agr* types was performed by two multiplex PCRs as described elsewhere (Shopsin et al., 2003). SCC*mec*-typing was carried out by multiplex PCRs using sets of region-specific primers, as previously described (Zhang et al., 2005). Identification of the new recently reported variant of SCC*mec* IV (IVNv)

was performed by PCR (Sola et al., 2012). Multilocus Sequence Typing (MLST) was implemented by PCR and sequencing in 11 selected MRSA isolates (one isolate of each *spa*-type detected) (www.saureus.mlst.net). The Clonal Complexes (CC) of the isolates was assigned according to the ST determined (in 11 isolates studied) or to the *spa*-type detected (in the remaining 193 isolates) (Lozano et al., 2012). PFGE with *ApaI* enzyme was performed in one MRSA isolate of each *spa*-type detected and in 18 of the MRSA t067 isolates to study their clonal relationship (Murchan et al., 2003).

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing to 17 antimicrobial agents was carried out by disk-diffusion method (CLSI, 2011). Antibiotics tested were as follows (in µg/disk): penicillin (10), oxacillin (1), cefoxitin (30), erythromycin (15), clindamycin (2), lincomycin (15), gentamicin (10), kanamycin (30), tobramycin (10), tetracycline (30), ciprofloxacin (5), chloramphenicol (30), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25+23.75), vancomycin (30), teicoplanin (30), mupirocin (5 and 200) and linezolid (30). CLSI breakpoints were used for all antimicrobial agents, except for lincomycin in which the breakpoints recommended by the Société Française de Microbiologie were considered [http://www.sfm.asso.fr].

Genotype of resistance

The presence of the *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(T), *msr*(A)/*msr*(B), *mph*(C), *lnu*(A), *vga*(A), *vga*(C), *lsa*(C), *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *aac*(6')-Ie-aph(2'')-Ia, *ant*(4')-Ia, *aph*(3')-IIIa, *dfr*S1, *dfr*D, *dfr*G, *dfr*K, *mup*A, *fex*A, *cfr*, *cat*(pC194), *cat*(pC221), and *cat*(pC223) resistance genes was tested by PCR (Gómez-Sanz et al., 2010; Schnellmann et al., 2006). Mutations in quinolone targets were determined by sequence analysis of the *grrA* and *gyrA* genes in the 13 quinolone resistant MRSA isolates from blood samples (Lozano et al., 2011). Sequences were compared with those previously reported (GenBank accession numbers D67075 and M86227, *grrA* and *gyrA* respectively).

Virulence factors

The presence of the genes encoding PVL (*lukSF-PV*), Toxic Shock Syndrome Toxin TSST-1 (*tst-I*), Exfoliative Toxins A, B, and D (*eta*, *etb*, *etd*), and Haemolysins alpha-, beta-, delta-, gamma- and gamma-variant (*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, *hlg*) was determined by PCR (Jarraud et al., 2002; Lina et al., 1999; Lozano et al., 2011). The 18 genes that encode staphylococcal enterotoxins (SEs) (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, and *seu*) were investigated by three multiplex PCRs (Hwang et al., 2007). Positive and negative controls were always included in each reaction.

3. Results

Molecular typing of MRSA strains.

The CC-*agr*-SCC*mec* occurrence and the *spa*-types detected in each period are shown in **Fig. 1**. The most frequent *spa*-type detected in both periods among our strains was t067, being more prevalent in 2001 (93%) than in 2009 (71%). Another detected *spa*-type in both periods was t008, although an important increase in its frequency was observed in 2009 respect to 2001 (16% and 1%, respectively) (**Fig. 1**). The remaining *spa*-types identified were only found in one of the two periods. The detected *spa*-types only in MRSA strains of 2001 were t012, t051, t109, and t1318 (6%) and in MRSA strains of 2009 were t002, t024, t032 t190, and t2849 (13%). MLST was implemented in 11 selected MRSA strains (one strain of

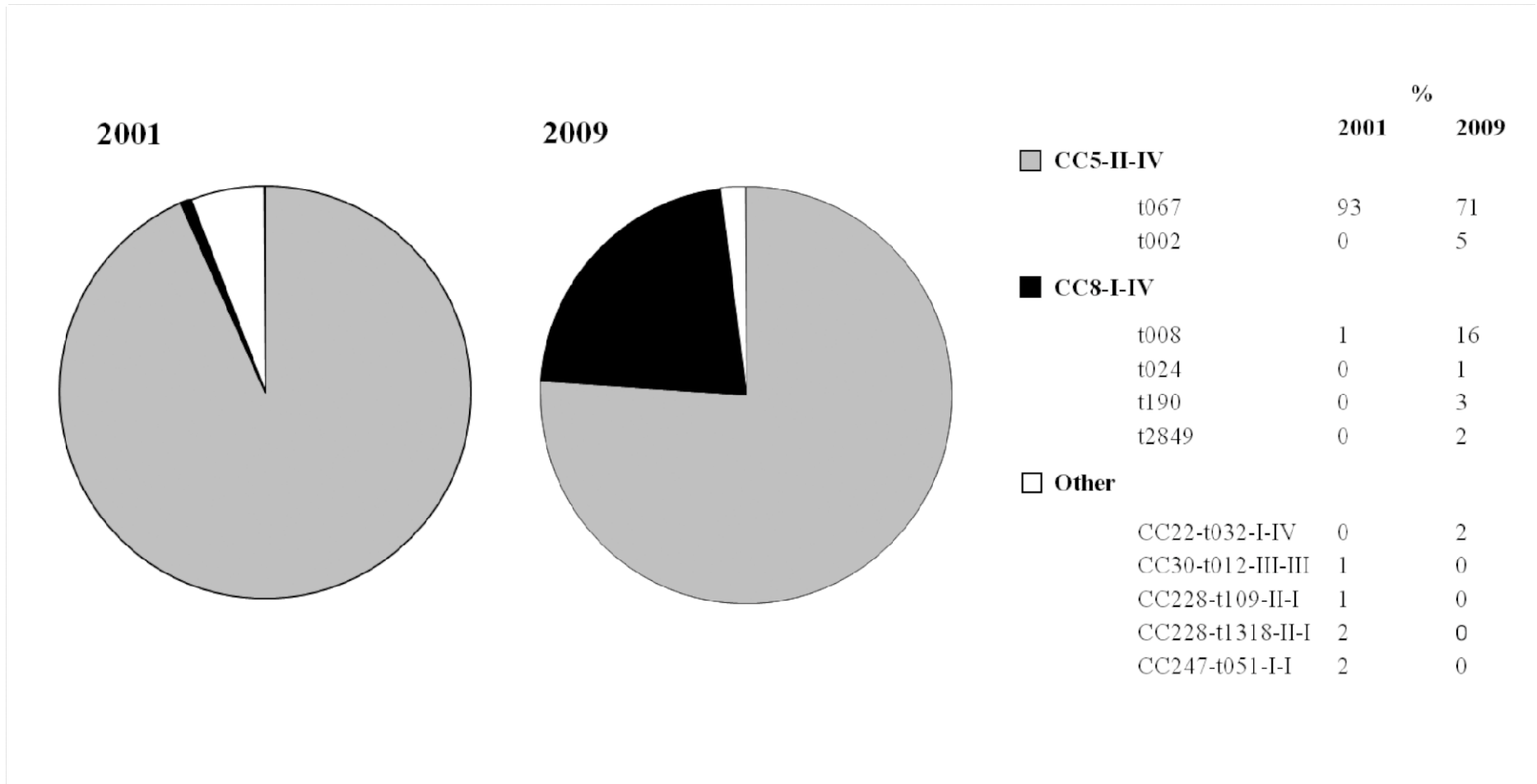


Fig. 1 CC-agr-SCCmec and spa-types detected in each studied year.

Table 1 Resistance profiles, resistance genotypes and CC-*spa* types of the studied MRSA.^a

CC ^b (<i>spa</i> -types)	Resistance profile ^c	No. of strains		Resistance genes (No. of strains 2001/2009)
		2001	2009	
CC5 (t067/t002)	TOB-KAN-CIP	57	38	<i>ant(4')-Ia</i> (57/38), <i>aph(3')-IIIa</i> (5/3)
	GEN-TOB-KAN-CIP	8	3	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (8/3), <i>ant(4')-Ia</i> (7/3), <i>aph(3')-IIIa</i> (0/2)
	ERY-CLI- TOB-KAN-CIP	23	11	<i>msr(A)/msr(B)</i> (9/0), <i>mph(C)</i> (2/0), <i>erm(A)</i> (1/0), <i>erm(B)</i> (4/1), <i>erm(C)</i> (19/11), <i>ant(4')-Ia</i> (16/11)
	ERY-CLI- GEN-TOB-KAN-CIP	4	1	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (4/0), <i>erm(B)</i> (1/0), <i>erm(C)</i> (2/1), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (3/1), <i>ant(4')-Ia</i> (3/1)
	ERY- TOB-KAN-CIP	1	4	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/3), <i>mph(C)</i> (1/3), <i>ant(4')-Ia</i> (1/4), <i>aph(3')-IIIa</i> (0/4)
	CIP	1	1	
	ERY- GEN-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/0), <i>mph(C)</i> (1/0), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0)
	GEN-TOB-KAN-SXT	1	0	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0), <i>dfxS1</i> (1/0)
	ERY- KAN-CIP	0	6	<i>msr(A)/msr(B)</i> (0/6), <i>mph(C)</i> (0/4), <i>aph(3')-IIIa</i> (0/6)
	GEN-TOB-KAN-MUP-CIP	0	2	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/2), <i>ant(4')-Ia</i> (0/2), <i>mupA</i> (0/2)
	GEN-TOB-KAN -MUP	0	2	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/2), <i>ant(4')-Ia</i> (0/2), <i>mupA</i> (0/2)
	ERY-CLI-KAN-CIP	0	1	<i>msr(A)/msr(B)</i> (0/1), <i>mph(C)</i> (0/1), <i>erm(B)</i> (0/1), <i>aph(3')-IIIa</i> (0/1)
	Only oxacillin	0	1	
	TOB-KAN	0	1	<i>ant(4')-Ia</i> (0/1)
	ERY-CLI	0	1	<i>erm(C)</i> (0/1)
	ERY-CLI-CIP	0	1	<i>msr(A)/msr(B)</i> (0/1), <i>mph(C)</i> (0/1), <i>erm(C)</i> (0/1)
	ERY-CIP	0	1	<i>msr(A)/msr(B)</i> (0/1), <i>mph(C)</i> (0/1)
	TOB-KAN -CIP-MUP	0	1	<i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	ERY- TOB-KAN-CIP-MUP	0	1	<i>mph(C)</i> (0/1), <i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	ERY-CLI- GEN-TOB-KAN	0	1	<i>erm(A)</i> (0/1), <i>erm(C)</i> (0/1), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/1)
CC8 (t008/t024/t190/t2849)	ERY-CLI-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>erm(C)</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0)
	TOB-KAN-CIP	0	7	<i>ant(4')-Ia</i> (0/7)
	GEN-TOB-KAN-MUP	0	3	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/3), <i>ant(4')-Ia</i> (0/3), <i>mupA</i> (0/3)
	CIP	0	2	
	GEN-TOB-KAN-CIP	0	2	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/2), <i>ant(4')-Ia</i> (0/2), <i>aph(3')-IIIa</i> (0/1)
	Only oxacillin	0	1	
	TET	0	1	<i>tet(K)</i> (0/1)
	GEN-TOB-KAN	0	1	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/1), <i>ant(4')-Ia</i> (0/1)
	ERY-CLI-TOB-KAN	0	1	<i>erm(C)</i> (0/1), <i>ant(4')-Ia</i> (0/1)
	TOB-KAN-CIP-MUP	0	1	<i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	ERY-GEN-TOB-KAN-CIP-MUP	0	1	<i>msr(A)/msr(B)</i> (0/1), <i>mph(C)</i> (0/1), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/1), <i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	GEN-TOB-KAN-MUP-CIP	0	1	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (0/1), <i>mupA</i> (0/1)
	TOB-KAN-CIP-CHL	0	1	<i>ant(4')-Ia</i> (0/1), <i>cat(pC221)</i> (0/1)
	CC22 (t032)	CIP	0	2
CC30 (t012)	ERY-CLI-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (1/0), <i>erm(B)</i> (1/0), <i>erm(C)</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0)
CC228 (t109/t1318)	GEN-TOB-KAN-CIP	2	0	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (2/0), <i>ant(4')-Ia</i> (2/0)
	ERY-CLI-GEN-TOB-KAN-CIP	1	0	<i>msr(A)/msr(B)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (1/0), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (1/0), <i>ant(4')-Ia</i> (1/0)
CC247 (t051)	ERY-CLI-GEN-TOB-KAN-CIP-TET	2	0	<i>tet(M)</i> (2/0), <i>tet(L)</i> (1/0), <i>tet(K)</i> (1/0), <i>erm(A)</i> (2/0), <i>erm(B)</i> (1/0), <i>msr(A)/msr(B)</i> (2/0), <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (2/0), <i>ant(4')-Ia</i> (2/0)

^aThe resistance profile present in strains of both periods are marked in shading.^bCC was assigned according to the determined ST or the detected *spa*-type . The *spa*-types associated with these CCs are shown in parenthesis.^cTET, tetracycline; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; CIP, ciprofloxacin; MUP, mupirocin; CHL, chloramphenicol; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

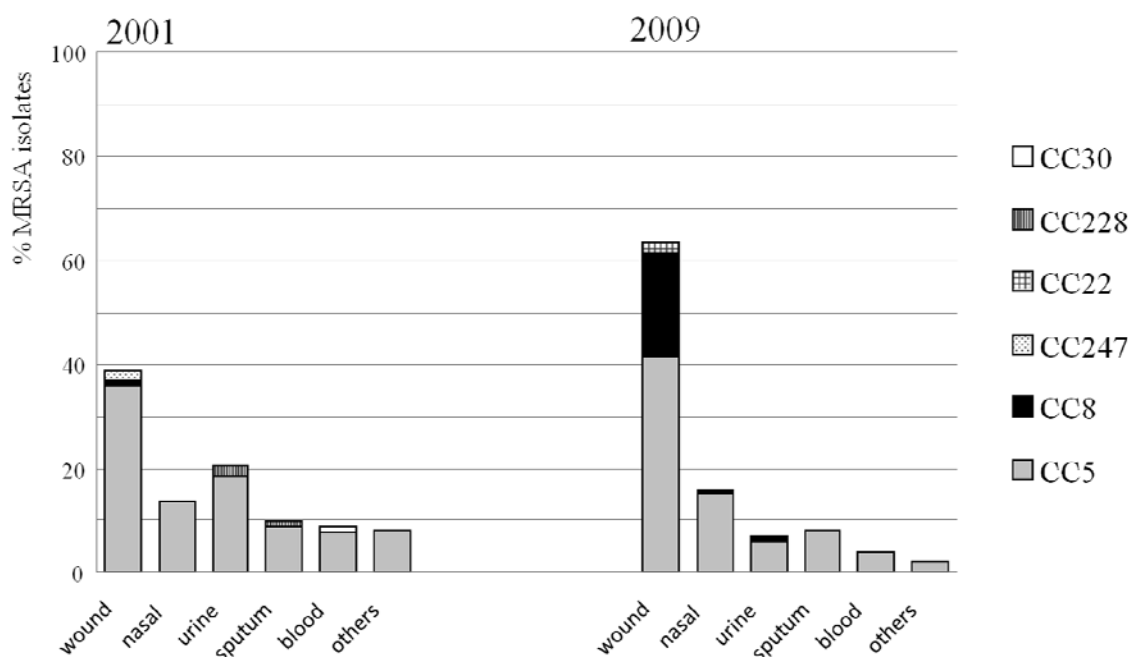


Fig. 2 Origin of the isolates and clonal lineages detected in 2001 and 2009. Others include bronchial and tracheal aspirate, abdominal and pleural fluid, ear, and catheter.

each *spa*-type detected) and the following STs were detected (*spa*-types): ST8 (t008, t024, t190, and t2849), ST22 (t032), ST30 (t012), ST125 (t067), ST146 (t002), ST228 (t109 and t1318), and ST247 (t051). These STs belonged to six different CCs, and in the remaining strains (in which MLST was not performed) the CC was assigned based on the *spa*-type detected. Thus, according to these criteria, the following CCs were found (%2001/%2009): CC5 (93/76), CC8 (1/22), CC22 (0/2), CC30 (1/0), CC228 (3/0), and CC247 (2/0) (**Fig. 1**). Therefore, most of the strains presented *spa*-types associated with CC5 and, it is remarkable the high and significant percentage of MRSA strains with *spa*-types related to CC8 found in 2009 (**Fig. 1**).

The most frequent detected *SCCmec* type was *SCCmec* IVc ($\geq 94\%$ in both periods) and it was associated with strains of CC5, CC8 and CC22. Other subtypes of *SCCmec* type IV were detected in very low percentages: the *SCCmec* type IVa was detected in two MRSA CC8 (t008 and t024) strains and the new variant of *SCCmec* type IV in one MRSA CC5-t002 strain. The MRSA strain belonging to CC30 showed the *SCCmec* type III, and the three MRSA CC228 strains and the two MRSA CC247 strains had *SCCmec* type I. Three types of *agr* were detected (%2001/%2009): *agr* I (3/24), *agr* II (96/76), and *agr* III (1/0). The strains belonging to a same CC showed the same *agr* type.

In addition, 28 MRSA strains were studied by PFGE using *ApaI* restriction enzyme (one strain of each *spa*-type and 18 MRSA CC5-t067 strains). Eight unrelated pulsotypes were identified (A-G); moreover, 4 subtypes were revealed in pulsotype A (A1-A5) and 2 subtypes in pulsotype C (C1 and C2). The distribution of pulsotypes was as follows: A (A1-A5)/CC5-t067, B/CC5-t002, C1/CC8-t008-t190-t2849, C2/CC8-t024, D/CC22-t032,

E/CC30-t012, F/CC228-t109-t1318, G/CC247-t051. All 18 t067 tested strains were clustered into 5 closely related PFGE patterns (A1-A5).

Origin of MRSA strains.

The MRSA strains included in this study were obtained from samples of different origins (**Fig. 2**). Most of MRSA were isolated from wound, representing 39% in 2001 and 63% in 2009. Samples of other origins in which MRSA isolates were found were (%2001/%2009): nasal (14/16), urine (20/7), sputum (10/8), blood (9/4), and others (8/2). The correlation between the origin of the strains and the CC is shown in **Fig. 2**. The MRSA CC5 strains were the most frequent ones in all origins.

Phenotype and genotype of resistance

Table 1 shows the percentages of antimicrobial resistance of strains of both periods. In general, the level of resistance to quinolones, aminoglycosides, macrolides, lincosamides and tetracycline remained more or less constant in both periods although it seems that there could be a slight downward trend in 2009 (**Fig. 3**). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole was only detected in one MRSA strain of 2001 and resistance to mupirocin and chloramphenicol was only detected in MRSA strains of 2009. Moreover, in 2001, more strains showed a multiresistant phenotype than in 2009, presenting these strains a high number of resistance genes. None of the 204 MRSA strains showed glycopeptide-resistance. Table 1 shows the different resistance patterns and the detected resistance genes in the 204 MRSA strains.

Different resistance profiles were found in strains of both periods, being lower in strains of 2001 than in strains of 2009 (Table 1). Quinolone-resistance was the most frequently found among the 204 MRSA strains. The 13 quinolone-resistant MRSA strains from blood samples showed the amino acid changes Ser80Phe in GrlA and

Ser84Leu in GyrA. Aminoglycoside-resistance was also very common, the *ant(4')-Ia* gene being the most frequently found. The level of resistance to tobramycin and kanamycin in 2001 and 2009 was very high, while the resistance to gentamicin was moderate. The level of macrolide-resistance was similar in strains of both periods but the percentage of clindamycin-resistance was higher in 2001 (30%) than in 2009 (17%) (Fig. 3). Hence, the *erm* genes were more commonly found in strains of 2001 than in strains of 2009.

Tetracycline-resistance appeared in a very low percentage of strains of both periods, and different combinations of *tet(K)*, *tet(L)* and *tet(M)* genes were detected among them (Table 1). The only one trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant MRSA strain of 2001 presented the *dfpS1* gene. Alternatively, it is relevant the detection of 11 mupirocin-resistant strains in 2009 which harbored the *mupA* gene. Resistance to chloramphenicol was only detected in one strain in 2009 and was associated with the presence of the gene *cat(pC221)* gene.

Virulence gene profile

Different virulence gene profiles were detected in the 204 MRSA strains (Table 2). The majority of MRSA strains (99%) were positive for at least one SE gene, and additionally most of them carried the *hla*, *hnb*, *hld*, and *hlg* genes. An association between SE gene profiles and CC was detected in most of the cases. The SE genes located in *egc*-cluster (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, and *seo*) were found in strains with *spa*-types associated with CC5, CC22, CC30, and CC228. In some cases, the *egc*-cluster appeared in strains which also showed the *seu* (called in that case *egc*-like cluster), *sea* and/or *sep* genes. The *egc*-cluster and the

sed, *sej*, and *ser* genes were identified in one strain. Interestingly, *egc*-like cluster was contained in a higher number of CC5-t067 strains in 2001 (31%) than in 2009 (4%). The combination of the *sed*, *sej*, and *ser* genes and the *sea* gene was observed in several strains belonging to CC8. The *tst-1* gene was identified in four strains (one CC30 and three CC5) of 2001 and was not detected in strains of 2009. Two MRSA CC8 strains with *spa*-types t008 and t024 were PVL positive. Both strains were obtained in 2009 and were the only ones with SCCmec type IVa. Lastly, the two MRSA CC247 strains showed the *sea* gene in addition to the *hla*, *hnb*, *hld*, and *hlg* genes.

4. Discussion

Two hundred and four MRSA strains obtained from a Spanish Hospital in two different years (2001 and 2009) were included in this study. The prevalence of MRSA strains was slightly higher in 2001 (29%) than in 2009 (27%). In some studies carried out in Spain a progressive increase of the oxacillin-resistance level was detected from 1986 (2%) until 2002 (31%) (Cuevas et al., 2004) which seemed to be stabilized in 2006 (30%) (Cuevas et al., 2008). In Europe, according to the last data of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), seven countries (Austria, Cyprus, Estonia, France, Greece, Ireland and the UK) reported decreasing trends for invasive MRSA, whereas an increasing trend was observed in other four countries (Italy, Hungary, Germany and Slovenia) (EARSS, 2010). In any case, the rates above 25% detected in more than one fourth of European countries, among them Spain (EARSS, 2010),

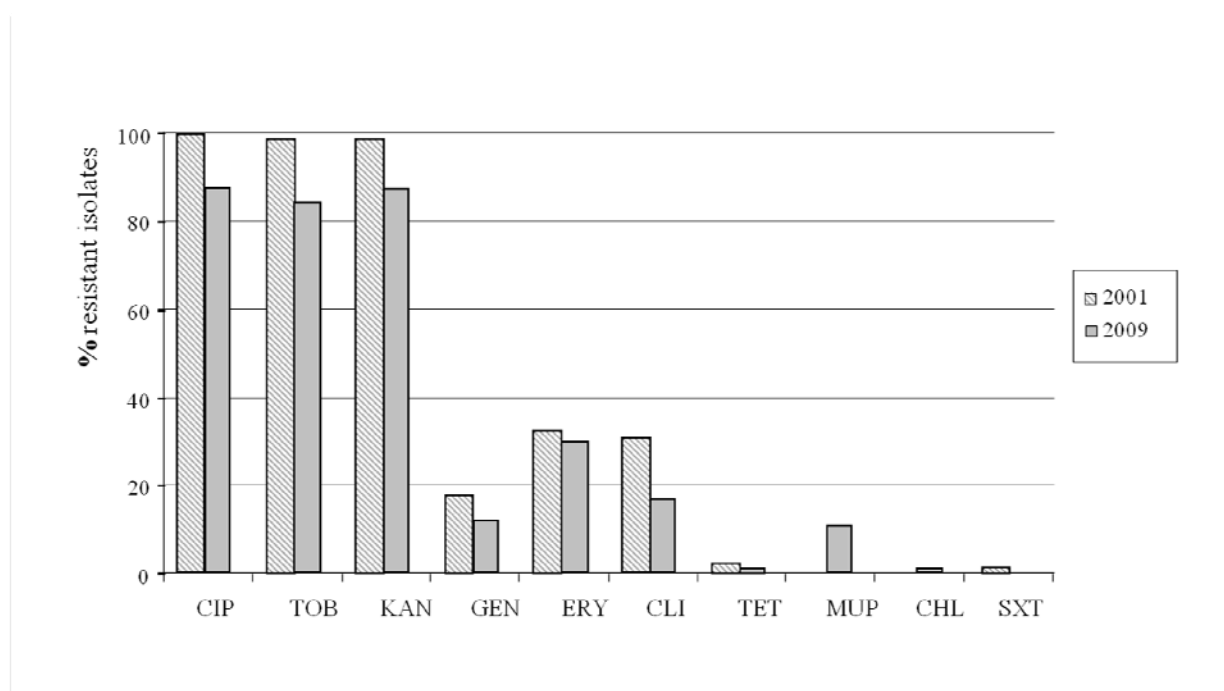


Fig. 3 Percentages of resistance detected in the MRSA isolates of each year in this study. CIP, ciprofloxacin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; GEN, gentamicin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TET, tetracycline; MUP, mupirocin; CHL, chloramphenicol; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

Table 2 Combinations of detected virulence genes in the 204 studied MRSA isolates according to clonal lineages and the year of isolation.

CC ^a - <i>spa</i> (2001/2009)	Leukocidin and haemolysin genes	PTSAg ^b	No. of positive strains	
			2001	2009
CC5-t067 (96/72)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc^c</i>	25	22
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep</i>	27	39
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc-like^d</i>	17	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc-like, sep</i>	11	2
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc</i>	4	0
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc, sep</i>	5	1
	<i>hla, hld, hlg</i>	<i>egc, sep</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc, sep</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc-like, sep</i>	2	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, tst-I</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep, tst-I</i>	2	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>		0	1
	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sep</i>	0	1
	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep</i>	0	4
CC5-t002 (0/5)	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>egc, sep</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sep</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sed-sej-ser</i>	0	2
CC8-t008 (1/16)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea, sed-sej-ser</i>	0	13
	<i>hla, hlb, hld</i>	<i>sea, sed-sej-ser</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea</i>	1	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v, lukS/F-PV^e</i>		0	1
CC8-t024 (0/1)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v, lukS/F-PV^e</i>		0	1
CC8-t190 (0/3)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea</i>	0	3
CC8-t2849 (0/2)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sep</i>	0	1
	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sed-sej-ser</i>	0	1
CC22-t032 (0/2)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>egc</i>	0	2
CC30-t012 (1/0)	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc-like, tst-I</i>	1	0
CC228-t109 (1/0)	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc, sea</i>	1	0
CC228-t1318 (2/0)	<i>hla, hld, hlg_v</i>	<i>egc, sea</i>	1	0
	<i>hla, hlb, hld, hlg</i>	<i>egc, sea</i>	1	0
CC247-t051 (2/0)	<i>hla, hlb, hld, hlg_v</i>	<i>sea</i>	2	0

^aCC was assigned according to the determined ST or the detected *spa*-type. The total number of isolates that presented the corresponding CC in each year is shown in parenthesis.

^bPTSAg, pyrogenic toxin superantigen.

^c*egc*, enterotoxin gene cluster (*seg, sei, sem, sen, seo*).

^d*egc-like*, enterotoxin gene cluster (*seg, sei, sem, sen, seo, and seu*).

^eThe SCCmec-type IVa was associated with *lukS/F-PV* gene.

are worrisome, being the MRSA problem a public health priority.

It has been observed that, in contrast to MSSA, MRSA *spa*-types principally have a regional distribution in European countries (Grundmann et al., 2010). In our work, the t067 *spa*-type was the most prevalent one in both periods. This *spa*-type is the most frequently found in Spain (Pérez-Vázquez et al., 2009) and also quite common in Finland as recently reported (Vainio et al., 2011), however, it has been found in a very low frequency in other European countries such as France, Belgium, Norway and Denmark, among others; in the United States and in South America (Fossum and Bukholm, 2006; Grundmann et al., 2010; [t067.shtml\). Additionally, the *spa*-type t067 is usually associated with ST125 and, in some cases, with ST5 \(both included in CC5\), SCCmec type IV and *agr* type II. The most common subtypes of SCCmec IV are normally IVa and IVc, which have been detected in variable percentages according to the different studies \(Argudín et al., 2009; Pérez-Vázquez et al., 2009\). All our MRSA CC5-t067 strains presented the same subtype \(SCCmec type IVc\). Moreover, the association between MRSA CC5-t067 and ciprofloxacin, tobramycin and erythromycin-resistance has been described. The resistance genes responsible for this tobramycin/kanamycin and erythromycin phenotypes are mainly the *ant\(4''\)*-Ia and *msr\(A\)/msr\(B\)* genes, respectively \(Pérez-Vázquez et al., 2009\). In our study, a](http://spa.ridom.de/spa-</p>
</div>
<div data-bbox=)

high percentage of CC5-t067 strains harbored the *ant(4')-Ia* gene and regarding to erythromycin, a moderate percentage of the CC5-t067 strains showed resistance to this antibiotic and many of these strains contained the *msr(A)/msr(B)* genes. However, these resistance mechanisms, and mainly the *ant(4')-Ia* gene, were also found in most of MRSA non-CC5-t067 strains in our study.

Another *spa*-type (t002) related to clonal complex CC5 was identified in our strains of 2009. This *spa*-type has been already detected in other studies carried out in Spanish hospitals (Argudín et al., 2009; Pérez-Vázquez et al., 2009; Vindel et al., 2009). It is interesting to remark that one MRSA CC5-t002 strain presented the new variant of SCC*mec* type IV, which had been previously described in strains with the same *spa*-type of Argentina (Sola et al., 2012).

The prevalence of MRSA CC8 in 2009 with respect to 2001 is outstanding. While in 2001 only one strain belonging to CC8 was identified (1%), 22% of the strains were of this lineage in 2009. Some STs belonging to CC8 have been considered predominantly as CA-MRSA. Moreover, most of our MRSA-CC8 strains were obtained from wound samples and CA-MRSA usually causes skin and soft tissue infections. The substitution of HA-MRSA strains by CA-MRSA strains has been already reported by others (David and Daum, 2010).

Interestingly, differences between HA-MRSA and CA-MRSA are less clear with time (David and Daum, 2010). Thus, most of our MRSA CC8 strains showed resistance, in addition to beta-lactams, also to aminoglycosides, quinolones, mupirocin, macrolides or lincosamides. Moreover, only two strains harbored the PVL genes. These two PVL-positive MRSA CC8 strains showed typical characteristics of CA-MRSA due to they presented SCC*mec* type IVa and were isolated from skin infections. Moreover, one of them was only resistant to oxacillin and the other one to oxacillin and tetracycline. CA-MRSA CC8 (known as USA300 clone) was firstly detected in USA but it has been spread to several European countries, Canada, South America and Asia (Deurenberg and Stobberingh, 2008; Vandenesch et al., 2010). Interestingly, some of CC8 and CC5 strains of 2009 showed mupirocin resistance. The emergence of this resistance has been already described in other hospitals (Chen et al., 2010) and could be produced by the mupirocin use for treating nasal MRSA carriers.

Other detected CCs (CC22, CC30, CC228 and CC247) in our study have been previously described in studies carried out in our country (Argudín et al., 2009; Pérez-Roth et al., 2004; Pérez-Vázquez et al., 2009; Vindel et al., 2009). CC22 is a British clone (EMRSA-15) which was detected in Spain in 1999 and it has been always found in a very low percentage (<2%) (Pérez-Roth et al., 2004). MRSA CC30 (EMRSA-16) has been usually described showing the SCC*mec* types II or IV (Pérez-Vázquez et al., 2009; Vindel et al., 2009). However, our MRSA CC30 strain presented SCC*mec* type III and, in the only description of this type of SCC*mec* in CC30, an association with Tn6072 was established (Chen et al., 2010). CC228 (Southern German clone) is, in addition to CC5 (pediatric clone), one of the major HA-MRSA clones widely disseminated around the world (Deurenberg and Stobberingh, 2008). The two MRSA CC247 strains were the only tetracycline-resistant ones of 2001 and this CC is known as the Iberian clone. In several studies performed in Spanish Hospitals this CC was found to be the dominant

one in the 90's. However, its presence was decreasing in subsequent studied years (Gasch et al., 2011; Pérez-Roth et al., 2004). Interestingly, in our study, CC247 was only detected in two strains of 2001, being not identified in strains of 2009.

The *tst-1* gene was detected in four strains of 2001; three of them belonged to CC5-t067 and the other one to CC30-t012. CC5-t067 strains harboring the *tst-1* gene have been detected in Spain (Argudín et al., 2009) and a TSST-1 CC5 clone has been recently described in France (Robert et al., 2011). Moreover, an association between TSST-1 and CC30 has been previously reported (Deurenberg et al., 2009).

It seems to be a linkage between SE genes and the clonal background (Holtfreter et al., 2007). In our study, the *egc* cluster was detected in strains belonging to CC5, CC22, CC30 and CC228. This is in accordance with the results obtained by others where *egc* was detected in CC5, CC22, and CC30 strains but not in CC8 strains (Holtfreter et al., 2007; Lozano et al., 2011). In some of our strains the *seu* gene was detected (*egc*-like cluster), being this fact more frequent in 2001 than in 2009. The combination of the *sed*, *sej*, and *ser* genes was identified in 15 CC8 strains (t008 and t2849, *spa*-types) and in two CC5-t002 strains. These genes are located on the plasmid pIB485 (Omoe et al., 2003) and their presence in CC8 and CC5 strains has been previously described (Monecke et al., 2011). Moreover, a strong linkage between the plasmid borne SE genes (*sed*, *sej*, and *ser*) and CC8 has been suggested (Holtfreter et al., 2007). Other SE genes identified were *sea* and *sep*, both located on bacteriophages (Baba et al., 2002; Chiang et al., 2008). The *sea* gene was mainly found in CC8, CC228, CC247 strains and the *sep* gene in CC5 (but also in one CC8 strain). The detection of the *sea* gene in several CCs is explained by the broad distribution of this gene (Holtfreter et al., 2007). Moreover, it has been observed that the *sep* gene is more frequent in MRSA *agr* type II strains than in MSSA strains (Argudín et al., 2009).

In conclusion, the most commonly found *spa*-type in both periods was t067 associated to CC5. This CC5-t067 lineage is still predominant in our country and it is associated with resistance to quinolones, aminoglycosides and in a lesser extent to macrolides. A possible emergence of CC8 is identified in the second period with two PVL positive MRSA strains. The presence of four TSST positive strains in the first period is also remarkable. The level of resistance among MRSA remains more or less constant in both periods although it seems that there could be a slight downward trend in 2009. This fact would be very positive and requires further research. The surveillance of genetic lineages, antibiotic resistance mechanisms and virulence traits of MRSA strains in our hospitals is highly important to better understand the behavior of this microorganism.

Acknowledgement

This work was supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. C. Lozano has a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain, N. Porres-Osante has a fellowship from the Instituto de Salud Carlos III. Part of these data were presented at the XIV Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica that was held in Barcelona, Spain, 19-22 May 2010.

References

- Argudín, M.A., Mendoza, M.C., Méndez, F.J., Martín, M.C., Guerra, B., Rodicio, M.R., 2009. 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.* 47, 2097-2105.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K., 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 359, 1819-1827.
- Chen, L., Mediavilla, J.R., Smyth, D.S., Chavda, K.D., Ionescu, R., Roberts, R.B., Robinson, D.A., Kreiswirth, B.N., 2010. Identification of a novel transposon (Tn6072) and a truncated staphylococcal cassette chromosome *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3347-3354.
- Chiang, Y.C., Liao, W.W., Fan, C.M., Pai, W.Y., Chiou, C.S., Tsen, H.Y., 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 66-73.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty first informational supplement. M100-S21. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Cuevas, O., Cercenado, E., Goyanes, M.J., Vindel, A., Trincado, P., Boquete, T., Marín, M., Bouza, E., Grupo Español para el Estudio de Estafilococo., 2008. [*Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006)]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26, 269-277.
- Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., Guinea, J., Sánchez-Conde, M., Sánchez-Somolinos, M., Bouza, E., 2004. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4240-4245.
- David, M.Z., Daum, R.S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 616-687.
- Deurenberg, R.H., Rijnders, M.I., Sebastian, S., Welling, M.A., Beisser, P.S., Stobberingh, E.E., 2009. 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.* 65, 116-122.
- Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E., 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 8, 747-763.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), 2010. Summary of latest data on antibiotic resistance in the European Union 2010. Available online: <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>.
- Fossum, A.E., Bukholm, G., 2006. Increased incidence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST80, novel ST125 and SCC*mec* IV in the south-eastern part of Norway during a 12-year period. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 627-633.
- Gasch, O., Ayats, J., Domínguez, M.A., Tubau, F., Liñares, J., Peña, C., Grau, I., Pallarés, R., Gudiol, F., Ariza, J., Pujol, M., 2011. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bloodstream infection: secular trends over 19 years at a university hospital. *Medicine (Baltimore).* 90, 319-327.
- 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.
- Grundmann, H., Aanensen, D.M., van den Wijngaard, C.C., Spratt, B.G., Harmsen, D., Friedrich, A.W., European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group., 2010. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 7, e1000215.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D., Ulrich, V., 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.
- Holtfreter, S., Grumann, D., Schmutde, M., Nguyen, H.T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Steinmetz, I., Witte, W., Bröker, B.M., 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2669-2680.
- Hwang, S.Y., Kim, S.H., Jang, E.J., Kwon, N.H., Park, Y.K., Koo, H.C., Jung, W.K., Kim, J.M., Park, Y.H., 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.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70, 631-641.
- Lina, G., Piémont, F., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128-1132.
- 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.
- Lozano, C., Rezusta, A., Gómez, P., Gómez-Sanz, E., Báez, N., Martín-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.

- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F.G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H.L., Weber, S., Ehrlich, R., 2011. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 6, e17936.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjö, U., Coombes, G., Cookson, B., 2003. 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. 41, 1574-1585.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect. Immun. 71, 6088-6094.
- Pérez-Roth, E., Lorenzo-Díaz, F., Batista, N., Moreno, A., Méndez-Alvarez, S., 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. J. Clin. Microbiol. 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., 2009. 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. 63, 21-31.
- Robert, J., Tristan, A., Cavalié, L., Decousser, J.W., Bes, M., Etienne, J., Laurent, F., ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de Résistance Bactérienne aux Antibiotiques), 2011. Pantone-valentine leukocidin-positive and toxic shock syndrome toxin 1-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a French multicenter prospective study in 2008. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 1734-1739.
- Schnellmann, C., Gerber, V., Rossano, A., Jaquier, V., Panchaud, Y., Doherr, M.G., 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.
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Said-Salim, B., Lina, G., Matsuka, A., Martínez, J., Kreiswirth, B.N., 2003. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J. Clin. Microbiol. 41, 456-459.
- Sola, C., Paganini, H., Egea, A.L., Moyano, A.J., Garnero, A., Kevric, I., Culasso, C., Vindel, A., Study Group of CA-MRSA in Children, Argentina-2007., Lopardo, H., Bocco, J.L., 2012. Spread of epidemic MRSA-ST5-IV clone encoding PVL as a major cause of community on set staphylococcal infections in Argentinean children. PLoS One. 7, e30487.
- Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., Mackenzie, F.M., 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods. Int. J. Antimicrob. Agents. 39, 273-282.
- Vainio, A., Koskela, S., Virolainen, A., Vuopio, J., Salmenlinna, S., 2011. Adapting *spa* typing for national laboratory-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 30, 789-797.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., Etienne, J., 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect. Dis. 9, 978-984.
- 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*., 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. J. Clin. Microbiol. 47, 1620-1627.
- Wulf, M.W., Markestein, A., van der Linden, F.T., Voss, A., Klaassen, C., Verduin C.M., 2008. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. Euro. Surveill. 13, pii:8051.
- 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.

**ANEXO 3: SECUENCIAS
REGISTRADAS EN EL GENBANK**

GenBank JQ861958.1

LOCUS JQ861958 2690 bp DNA circular BCT 14-JUN-2012
DEFINITION Staphylococcus aureus strain C5425 plasmid pUR5425, complete
sequence.
ACCESSION JQ861958
VERSION JQ861958
KEYWORDS .
SOURCE Staphylococcus aureus
ORGANISM Staphylococcus aureus
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2690)
AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Saenz,Y., Ruiz-Garcia,M., Royo,G.,
Gomez-Sanz,E., Gomez,P., Zarazaga,M. and Torres,C.
TITLE Genetic environment and localization of lnu(A) and lnu(B) genes of
MRSA and other staphylococci from animal and human origin
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 2690)
AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Saenz,Y., Ruiz-Garcia,M., Royo,G.,
Gomez-Sanz,E., Gomez,P., Zarazaga,M. and Torres,C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (29-MAR-2012) Area de Bioquimica y Biologia Molecular,
University of La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja
26006, Spain
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..2690
/organism="Staphylococcus aureus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="C5425"
/isolation_source="clinical sample"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:1280"
/plasmid="pUR5425"
/country="Spain"
gene 92..1096
/gene="rep"
CDS 92..1096
/gene="rep"
/function="essential for plasmid replication"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="replication protein"
/protein_id="AFM38038"
/translation="MQYNTTKYIDENQDNKTLKDMTKSGKQRPWREKKIDNVSYADILE
ILKIKKAFNVKQCGNVLEFKPTDEGYLKLHKTWFCCKLCPVCNWRAMKNSYQAQRV
IEEVVKEKPKARWLFLLTLSTKNAIDGDTLEQSLKHLTESFRRLFYKVKVSKNLIGFMR
STEVTVNKNDGSYNQHMHVLLCVENSYFKNKANYITQEEWISLWQKALQVNYRPVANI
KAIKPNQKGDKDIQAAIKETSKYSVKSSDFLTDDDERNQEI VNDLEKGLYRKRMLSYG
GLLKQKHKILNLDDAEDGNLINTSDEDKTTDEEEKAHSITAIWNFEKQNYLKD LKR"
rep_origin 1903..2058
/note="single-strand origin (sso) of replication of
plasmids via the rolling-circle mechanism"
misc_recomb 1903..1914
/note="recombination site B"
gene complement(2077..2562)
/gene="lnu(A)"
CDS complement(2077..2562)
/gene="lnu(A)"
/function="confers lincosamide resistance"

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="lincosamide nucleotidyltransferase"
/protein_id="AFM38039"
/translation="MKNNNVTEKDLFYILDLEFHEMKVTVWLDGGWGV DVLTKGQQREH
RDIDIDFDAQHTQKVIQKLEDIGYKIEVDWMP SRMELKHEEYGYLDIHPINLNDDGSI
TQANPEGGNYVFQNDWFSETNYKGRKIP CISKEAQLLFHSGYDLTEKDHFDIKNLKSI
T"

rep_origin 2608..2624
/note="double-strand origin (dso) of replication of
plasmids via the rolling-circle mechanism"

ORIGIN

1 tttttggagt tgaaaagaaa atttgacatg aaaaaacccc agttatatta ttaaggtgtc
61 gaatcttaaa taaaactggg gggcttttta tatgcaatat aataactacta aatatattga
121 cgaaaatcaa gataacaaaa cattaanaaga tatgacgaaa agtggggaagc aacgcccatg
181 gagagaaaag aaaattgata atgtaagtta tgcagacata ctggaaattht taaaaattaa
241 aaaggctttt aacgtaaaac aatgtggtaa cgtcttagag ttcaagccga ctgatgaagg
301 ttatttgaag ttacataaga catggttttg taaatcaaaa ttatgtccag tttgtaattg
361 gaggcgtgct atgaaaaata gttatcaagc tcaaagagtg attgaagaag tggttaagga
421 aaaaccgaaa gcacgttggc tatttctaag actttcaaca aaaaatgcta tagatgggga
481 tactttgaaa caaagtttga aacacttaac tgaatcattt agaagattat ttaaatataa
541 aaaagttagt aaaaatttaa ttggttttat gcgttcaaca gaagtaacag ttaataaaaa
601 tgacggcagt tataatcaac atatgcatgt tttgttatgt gttgaaaata gttattttaa
661 gaataaagct aattatataa ctcaagaaga atggattagt ttatggcaaa aagcattaca
721 agtgaattat cggccagtag caaatattaa agcgatcaaa ccaaatcaaa aaggcgataa
781 agatattcaa gcagctatca aagaaacctc taaatattcg gttaagtcat ctgatttttt
841 aactgatgat gatgaaagaa atcaagaaat cgtgaatgat ttggaaaaag gtttataaccg
901 aaaacgatg ttgagttatg gtggattgct taacacaaaa cataagattt taaatttaga
961 cgatgctgaa gatggtaatt tgattaatac aagtgatgaa gataaaacaa ctgacgaaga
1021 agaaaaagca cattcaatta cggcaatttg gaattttgaa aaacaaaatt attacttaaa
1081 agatttgaaa cgtttagctta aaagctagcg ttttttatgt atttttgccc ctgcggggaa
1141 tatagcgttc aaccagcatg gttgcccagt ttttatgcca atttttaaat ttgcatgtaa
1201 atgggcagtg tctcaaaaat tgcacactgg ttttgetcaa attttaattg gtgtaattaa
1261 aatataattt tttggctcat atttgcgttt taagagctta tatacgtttt taggtataaa
1321 actatatgat ttacccttaa ttcttttaaa tgccccctta aaattcaaaa taagggcata
1381 aaaaataaaa gctaccccaa aattgagata gcttttttct ttcgtacggt ctgtttatth
1441 ttctttcgac gccgtatcgt cgatggaatt caaaaaagtt atgggctata aatctacatc
1501 actttttcaa gaatgtagta gcaatattca agacaaatta atttttataa ctgctcggaa
1561 tatctcaagc cgtttcttta attttgaaat aaaaaaatcg acgaaggtcg attatggttt
1621 ttacacgcgt tcttttagaa cgcataagtg cgcccttacg ggatttaact agattataac
1681 gacgaaaatc agacctgtaa agcgataact attgtgctaa agtttgctaa aaaggagtth
1741 tgaagttgaa aaaaacagaa cgtaatttat tttctatttt cttatcttta ggaagtctth
1801 ttgctatctt tagtggtttc tttattttgg gcattggaat gttaatgggt ggagcaacth
1861 tattagctaa aagtatttct gaagaataaa agcgttgacg catttatgcc gagaaaatth
1921 attgtgcgct gagaagaacc cttaactaaa cttgcagacg aatgtcggca tagcgtgagc
1981 tattaagccg accattcgac aagttttggg attgttaagg gttccgaggc tcaacgctaa
2041 taaagcaatt ggaataaagc aattatgtha ttgattttat gttattgatt ttaaatthtt
2101 tatatcaaaa tggctttttt ctgttaaatc ataaccagaa tgaaaaagaa gttgagcttc
2161 ttttgaaata catgggtattt ttcgacctth gtaattagtt tctgaaaacc agtcattttg
2221 gaaaacataa ttaccacctt ctgggtttgc ttgggtaatt gatccatcat catttagatt
2281 tataggatga atatctaaat acccatattc ttcattgctta agttccatac gtgaaggcat
2341 ccaatcaact tctattttgt atccgatatc ttctaatttt tgtataactt tttgagtgtg
2401 ttgagcgtca aaatctatat ctatatctct gtgttctctt tgttgtttc cagttaatac
2461 atctaccccc cagccaccat ctaaccaata agttactttc atgtgttcaa ataaatctaa
2521 aatataaaat aaatcttttt ctgttacatt attatttttc attttatccc tctaactttg
2581 ggaatttgaa acgagttgaa aacgagtttc ttcttgcctt gatactatat agaaataacg
2641 ttcttcttta aaactatggt ttgtcgttga tatgacagtg tttttatgta

GenBank JQ861959.1

LOCUS JQ861959 12120 bp DNA linear BCT 14-JUN-2012
DEFINITION Staphylococcus aureus insertion sequence IS257 transposase (tnp) gene, partial cds; hypothetical protein, putative methyltransferase protein, aminoglycoside 6-adenylyltransferase (aadE), adenine phosphoribosyltransferase (apt), spectinomycin adenylyltransferase (spc), hypothetical proteins, ABC transporter, lincosamide nucleotidyltransferase (lnu(B)), and hypothetical protein genes, complete cds; and insertion sequence IS257 transposase (tnp) gene, complete cds.

ACCESSION JQ861959
VERSION JQ861959
KEYWORDS .
SOURCE Staphylococcus aureus
ORGANISM Staphylococcus aureus
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 12120)
AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Saenz,Y., Ruiz-Garcia,M., Royo-Garcia,G., Gomez-Sanz,E., Gomez,P., Zarazaga,M. and Torres,C.
TITLE Genetic environment and location of the genes lnu(A) and lnu(B) in MRSA and other staphylococci from animal and human origin
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 12120)
AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Saenz,Y., Ruiz-Garcia,M., Royo-Garcia,G., Gomez-Sanz,E., Gomez,P., Zarazaga,M. and Torres,C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (29-MAR-2012) Area de Bioquimica y Biologia Molecular, University of La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja 26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..12120
/organism="Staphylococcus aureus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="C2944"
/isolation_source="ear"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:1280"
/country="Spain"
gene complement(<1..614)
/gene="tnp"
CDS complement(<1..614)
/gene="tnp"
/note="transposase of element IS257"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="transposase"
/protein_id="AFM38040"
/translation="MDYFRYKQFNKDVITVAVSYYLRYALSYRDISEILRERGVNVHH
STVYRWVQEYAPILYQIWKKKHKAYYKWRIDETYIKIKGKWSYLYRAIDAEGHTLDI
WLRKQRDNHSAYAFIKRLIKQFGKPQKVITDQAPSTKVAIAKVIKAFKLPDCHCTSK
YLNNLIEQDHRHIKVRKTRYQSINTAKNTLKGIECIYALYKKNR"
mobile_element complement(<1..614)
/mobile_element_type="insertion sequence:IS257"
CDS 1007..1483
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFM38041"

/translation="MYRGELAISKILYAKNERLCELKKQAEIYPTALKKSLMNFIFIE
 AEFSLMFVKANAGVEDKYIAGHVFRIIISCLNQLVLFACNNAYCINEKKAIKLLETFEH
 KPEKYTEKVNHI FEVLGISLFCYDMTEKLYKEVNEIVSEINNFLNEESSDERKQI "
 CDS 1464..2198
 /note="contains conserved methyltransferase domain"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="putative methyltransferase protein"
 /protein_id="AFM38042"
 /translation="MKENKYDDNIFQKYSQMSRSQKGLAGAGEWETLKKMLPDFKGG
 RVLDLGCGYGHCIYAMENGASSVVGVDISHKMLEVAKGKTHFPQIEYECCAIEDVDF
 PEESFDVILSSLAHFHYVADYENLIKKIYRMLKAGGNLVFTVEHPVFTAHTQDQWYNE
 KGEILHFPVDNYYYEGKRTAMFLEEKVTKYHRTLTTYLNTLLSNSFIINQIIVEPQPPE
 NMMDIPGMADEMRRPMLLIVSAKKKM"
 gene 2231..3094
 /gene="aadE"
 CDS 2231..3094
 /gene="aadE"
 /function="streptomycin resistance protein"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="aminoglycoside 6-adenylyltransferase"
 /protein_id="AFM38043"
 /translation="MRSEKEMDLVLSLAEQDERIRIVTLEGSANINIPKDEFQDYD
 ITYFVSDIEPFISNDDWLNQFGNIIMMQKPEDMELFPPEEKGFSYLMLFDDYKIDLT
 LLPLEELDNYLKGDKLIKVLIDKCRIDIVPTDIDYHVRKPSAREYDDCCNEFWNV
 TPYVIKGLCRKEILFAIDHLNQLRFELLRMSWKVGIKTEFSLVSGKNYKYINKYID
 EDLWNRLLSTYRMSYENIWKSLFICHQLFREVSKEVAELLGFDYPEYGNITRYTED
 MYKKYVENDYF"
 gene 3138..3665
 /gene="apt"
 CDS 3138..3665
 /gene="apt"
 /note="similar to adenine phosphoribosyltransferase of
 Enterococcus faecalis, Thermotoga maritima, and Bacillus
 halodurans"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="adenine phosphoribosyltransferase"
 /protein_id="AFM38044"
 /translation="MESTDVINEIRGILPRNSIGKYDLLTIFTHKTVFDKIVKVLSD
 FQNKVDYVAAPEAIGWILGTAIKELGVGFIGVRKGDKLPYAKEEIIISTHFTDYSQD
 KSFEISKSSIVRNKRVLIVDDWIETGSQMKALIALLEKLDCSIIGLATIGIDINEVTQ
 KWIDSSFVAYIGSNI "
 gene 3878..4606
 /gene="spc"
 CDS 3878..4606
 /gene="spc"
 /note="similar to streptomycin 3''-adenylyltransferase of
 Staphylococcus aureus and the spectinomycin resistance
 protein from Staphylococcus aureus transposon Tn554"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="spectinomycin adenylyltransferase"
 /protein_id="AFM38045"
 /translation="MLIGVYLYGSAVMGLRMNSDVIDLIVITNQSLSEKTRRNLNRL
 MLISGKIGNIKDMRPLEVTVINQKDIVPWHFPPKYEFMYGEWLREQFEKGEIPESTYD
 PDLAILLAQLRKNSINLLGPKATEVIEPVPMTDIRKAIKESLPGLIASINGDERNVIL
 TLARMWLTASTGEIRSKDLAAEWAIPQLPDEHATLLNKAREAYLGECVDKWEGMESEV

AELVNHMKKSISSLNIQLPFRIV"
 CDS complement(5126..5584)
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical protein"
 /protein_id="AFM38046"
 /translation="MMTMCPRCLELYSEIWSKPCCKCADKTIPVDIELINVVQMLLTR
 GFDVSYATCYPDKEQGEIEAMEIEIHFRELYPQALFDGLPPDWIVIDEYPVLGGKVLDD
 EPVDILTCAIEYRFEESIHIQKDIAISNLETWLEEKDPQSCRAILLTAGF"
 CDS 5222..5554
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical protein"
 /protein_id="AFM38047"
 /translation="MDALFKSIFDCTCKDINRFIKNLTAKNWFVNYNVPVRWETIKES
 LRIQFPKVNLFHFSFDLTLFFIWWTSGIRYIEASSEQHLNDIDEFNINRNLGIGAFIT
 RLRPNFTV"
 CDS 6673..8157
 /note="contains ATP-binding domain"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ABC transporter"
 /protein_id="AFM38048"
 /translation="MSLINVSNLTFSEYEGSYDNIFENVSFQIDTDWKLGFIGNRGRGK
 TTFLNLLLKGKYAYSGNISSTVKFEYFPYDVEDKSLYTIIEVMKSICTECMDWEIFREIS
 LLDVQEDALYRPFNTLSNGEQTKVLLAALFLTASCFLLDIPEPTNHLDDIDARNVVQNYL
 KRKKGFILVSHDRSLDDQCVDHILSINKTNIEIQKGNFTSWWENKTLQDNFELAKNK
 LLKEIGRLSYAAKRSSNWSNKVEKSKYGTTSNGSKLDKGYVGHKAAKAMKRAKNIER
 HQEAVLQKSELLHNIEQYDDLKISPLEFHKECLIEANDLSLSYGDKVCSNLFNRVNI
 GDRVAIIGKNGSGKSSILKLINGDDIKFTGNFMLASGLKISYISQDTSYLKGNLSEFA
 YNNKIDETLFTILRKLDFNREQFDKNMVDVFSAGQKKKVLIAKSLCESAHLIWDDEPL
 NYIDIFSRIOIEKMILEYCPITLLFVEHDDAFCCNNICTKNINLGL"
 gene 8211..9014
 /gene="lnu(B)"
 CDS 8211..9014
 /gene="lnu(B)"
 /function="confers resistance to lincosamides"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="lincosamide nucleotidyltransferase"
 /protein_id="AFM38049"
 /translation="MLKQKELIANVKNLTESDERITACMMYGSFTKGEQDQYSDIEFY
 IFLKDSITSNFSSNWLFDVAPYLMLYKNEYGTEVVIFDNLIRGEFHFLEKDMNIIP
 SFKDSGYIPDTKAMLIYDETGQLENYLSEISGARNRLTEENANFLLCNFSNLWLMGI
 NVLKRGEYARSLELLSQLQKNTLQLIRMAEKNADNWLNMNLSKLEKEISLENYKKFAKT
 TARLDKVELFEAYKNSLLLVMDLQSHLIEQYNLKVTHDILERLLNYISE"
 CDS 11040..11264
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical protein"
 /protein_id="AFM38050"
 /translation="MTTAEMIKELCEQMNISVSELARRIGQTPQNFNKKLQRETVTLD
 ELKAIADVLGVKFVQAFILPDGEEIKISNE"
 mobile_element 11330..12120
 /mobile_element_type="insertion sequence:IS257"
 gene complement(11390..12064)
 /gene="tnp"
 CDS complement(11390..12064)
 /gene="tnp"

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="transposase"
/protein_id="AFM38051"
/translation="MDYFRYKQFNKDVITVAVSYYLRYALSRYRDISEILRERGVNVHH
STVYRWVQEYAPILYQIWKKKHKAYYKWRIDETIYIKIKGKWSYLYRAIDAEGHTLDI
WLRKQRDNHSAYAFIKRLIKQFGKPQKVIDQAPSTKVAMAKIIKAFKLPDCHCTSK
YLNNLIEQDHRHIKVRKTRYQSINTAKNTLKGIECIYALYKKNRRSLQIYGFSPCHEI
SIMLAS"

```

ORIGIN

```

1 ctgcggttct ttttatatag agcgtaaata cattcaatgc ctttgagtgt attttttgcc
61 gtattgatac tttgatatac tgtctttctt actttaatat gacgggtgac ttgctcaatg
121 aggttattca gatatttcga tgtacaatga cagtcagggt taagtttaaa agctttaatt
181 acttttagcta ttgctacttt cgttgaaggt gcctgatctg taattacctt ttgaggttta
241 ccaaattggt taatgagacg tttgataaac gcatatgctg aatgattatc tcggtgctta
301 cgcaacccaa tatctaattg atgtccctct gcatcaatgg cacgatataa atagctccat
361 tttcctttta ttttgatgta cgtctcatca atacgccatt tgtaataagc ttttttatgc
421 tttttcttcc aaatttgata caaaattggg gcatattctt gaacccaacg gttagactgtt
481 gaatgatgaa cgtttacacc acgttccctt aatatttcag atatatcacg ataactcaat
541 gcatacttta gatagtagct aacggctaca gtgataacat ccttggttaa ttgtttatat
601 ctgaaatagt ccatacagaa gactcctttt tgttaaaatt atactataaa ttcaactttg
661 caacagaacc gaaggcatcg tattaggggg ctcacgtgca agaggcacc atacagaaaa
721 ttctgatata gatatcgaa tctattacaa ttcagactca tttgacctga cagcgattaa
781 tcaaattgct acagaattgg atgataaaaa tagaaacaac cttgttgytc ctcccggagc
841 gtggggtgat tggattaatg gcggcggatg gttatttata aatgggtatc atgttgactt
901 gattttacgt gatataaaac gggtagaaca aataatcaaa gatacggagc aaggaattgt
961 tactgccaat tatcagaccg ggcattccca tggttatata agtgcaatgt atcgtggaga
1021 attagegatt agtaaaatac tatatgctaa gaacgaaagg ttatgcgaat taaaaagca
1081 ggcagaaatt taccctactg ctctaaagaa aagcttgatg aactttttta tatttgaagc
1141 tgaattctct ttaatgtttg taaaagcaaa tgcgggggta gaggataaat attatattgc
1201 aggccatggt tttcgtatta tttcatgctt aaatcaagta ctatttgcat gtaataatgc
1261 ttattgtatc aacgaaaaga aagctataaa actgcttgaa acttttgaa ataaacctga
1321 aaaatatacc gagaaggtaa atcataatct tgaagtactc ggtatctcac tttttgaatg
1381 ctacgatatg accgagaaac tttataaaga agtgaatgaa attgtatcgg agataaataa
1441 ctttttaaac gaggagagtt cagatgaaag aaaacaaata tgatgataat atattttttc
1501 aaaaatacag tcaaatgagt cgctcgcaaa aaggactggc tgggtgcggga gaatgggaga
1561 ctttgaaaaa gatgctacct gattttaagg gtaagcgtgt gcttgattta ggatgcggct
1621 atggatggca ctgtatatac gcgatggaaa acgggtgctc ctctgtagta ggtgttgata
1681 tttctcataa aatgctcgaa gtagcaaaag gaaaaacca tttccacag attgaatag
1741 aatgctgtgc catagaagat gtggatttcc cagaggagag ctttgatgta atactaagtt
1801 cgcttgctgt tcattatgta gcagactatg agaatttaat aaaaaagata tataggatgc
1861 tgaaggctgg tggcaattta gtttttacag ttgaacatcc tgtttttact gctcatggaa
1921 cacaagactg gtattataac gaaaaaggag aaatactgca tttcccgtg gacaattatt
1981 attatgaggg caaacggaca gctatgtttt tgggaagaaa gggtacaaaa tatcatagaa
2041 cactgaccac atatctaaat acactgcttt caaatagttt tataataaat cagattgtgg
2101 agccacagcc gccagagaac atgatggata ttccggggat ggcggatgaa atgacgagcc
2161 caatgatgct gattgtatcg gcaaaaaaga agatgtaata atatagaaaa aataaacgag
2221 gagtatgtaa atgagatcag aaaaagaaat gatggattta gtactttctt tagcagaaca
2281 ggatgaacgt attcgaattg tgacccttga ggggtcacgc gcaaatatta atatacctaa
2341 agatgaattt caggattatg atattacata ttttgtaagt gatatagaac cgtttatatac
2401 taatgatgac tggcttaatc aatttgggaa tataataatg atgcaaaagc cggaggatat
2461 ggaattattc ccacctgaag aaaagggatt ttctatctt atgctatttg atgattacaa
2521 taaaattgat cttaccttat tgcccttggg agagtttagat aattacctaa agggcgataa
2581 attaataaag gttctaattg ataaagattg tagaattaaa agggacatag ttccgactga
2641 tatagattat catgtaagaa agccaagcgc aagggagatg gatgattgct gcaatgaatt
2701 ttggaatgta acaccttatg ttattaaagg attgtgccgc aaagagatac tgtttgcaat
2761 cgatcatctg aaccagattc tacggtttga actacttagg atgatgctgt ggaagggttg
2821 gataaagaca gaattttcat taagtgttgg gaaaaattat aagtatatta acaaatatc
2881 tgatgaagat ctatggaata gattattatc tacatatcgc atggattcct atgaaaatat

```

2941 ttggaagtca ttatztatat gccaccaatt gttcagggaa gtgtccaaag aggtagcaga
3001 actactgggg tttgattatc cagagtatgg taagaacata acaagatata ccgaggacat
3061 gtataaaaaa tatgttgaaa atgactattt ttaaagatta gcaaagatta ttaaccataa
3121 gcaaggggtg taaatgtatg gaaagtactg atgttataaa tgaaattaga ggtatattac
3181 ctcgtaactc aattggaaaa tatgatttac taactatttt tacacataaa accgtttttg
3241 ataaaattgt aaaagtacta tcattggatt ttcaaaataa agtagattat gtggctgcc
3301 cagaagcaat tggatggata ctaggcactg ccatagccaa agaacttga gtggggttta
3361 ttggagtaag aaaaggtgat aagctgccat acgcaaaaga agagattatt tcgacacatt
3421 ttaccgacta ttcaggtcaa gataaaagct ttgaaatc taagagttct attgtgagga
3481 acaaaagagt tttgattgta gatgattgga tagagacagg ttctcaaatg aaggctttaa
3541 tagctttgtt agagaaattg gattgcagca ttattgggtt ggctactatt gggattgata
3601 taaatgaggt tactcaaaaa tggatagaca gcagttttgt agcttataatt ggctcaaaaca
3661 tataataaac cgaaagaaaa tcttgaatca aaattttga tggcgtaaat ttacaataca
3721 acgaaagatg tttactcttt ttttataaat ttttaagaggc gttaaaaaac agttttcaga
3781 cgaaaggaga tcgaagttga gtatagattt aagtaacaaa aaaattccga aagaagcaat
3841 tcaagcatta aaaactatag cggaaactact tgataatatg ttaattgggg tgtatttga
3901 tggttcggca gtaatgggtg gtttacgat gaatagcgat gtagatattt tggaataaac
3961 aatcaaaagt ttatctgaaa aaactcgaag gaatcttaca aatagggtta tgcttatatc
4021 tgggaaaaata ggaaacataa aagatatgag gcctctgaa gttacggta taaatcaaaa
4081 ggatattgtc ccttggcatt tccccccaa atatgaattt atgtatggcg agtggctaaag
4141 agagcagttt gaaaaggag aaattcctga gtcgacttat gatccggat tagcaatact
4201 tttagcacia ctaagaaaaa atagtattaa cttttggga ccaaaggcaa cagaagtaat
4261 tgagcctgtg ccaatgacag atattcgaag agcaattaa gaatcgttgc ccgggtgat
4321 agctagcatt aacggtgacg aacgcaatgt gattttaact ttagccagaa tgtggctgac
4381 agcatctact ggtgaaattc gctcaaaaaga tctggcagct gaatgggca tacctcaatt
4441 acccgatgag catgctactt tactcaacaa agcgagagag gcttatttag gagagtgtgt
4501 tgacaagtgg gaaggaatgg aatctgaggt ggctgaactc gttaatcata tgaaaaagtc
4561 tatagagtct tcccttaata tccaattacc ttttcaata gtttaaatat acaaaagact
4621 agttgttaat gtgcattatt gattgcttcg atatgttccc ccatatatca gtttcttaaa
4681 aaataatcaa aataccgttg atacgttccc gcgaacgaaa gggttaaaaa tcagcttaag
4741 acatcaatgc catcaactag agccacgttg agacgtgtgt tttattgtcc cacaaaagtg
4801 cagacgattt tatcagtgta aaaatggagt acgcagacga ccgaaaaatc cagccagatc
4861 gtatcaccta caggcttatt caggagtata tcgaagaaaa gtacggcttc aaagttcaca
4921 ctgcaaacat tgcagaggtc aaaagaaact taggcctgcc gatgtacgac gcaccaaacg
4981 cagttgaaga actaaaacgc ccatataaac cagcaccaga atataaagta gaagctatta
5041 aagacgcatt aaggcacttc aaggctatag attaaagtaa agtacccttt cagcagatca
5101 ttactgttga gagggctta ctttttcaga agccggccaa tgtaaggata gccctacaag
5161 attgctgggc tttctcttcg agccatgitt ccagattgct tatagcgata tccttttgaa
5221 tatggatgct ctcttcaaat cgatattcga ttgcacatgt aaggatatca acaggttcat
5281 caagaacctt accgccaaga actgggtatt cgtcaattac aatccagtca ggtgggagac
5341 catcaaagag agcctgcgga tacaattccc taaagtgaat ctcaatttcc atagcttcga
5401 tctcaccttg tctttatct gggtaacaag tggcataaga tacatcgaag cctctagtga
5461 gcagcatctg aacgacattg atgagttcaa tatcaacagg aatggcttca tcggcgcatt
5521 tacaacaagg ctctgaccaa atttcactgt atagctctaa acatcgtgga cacatcgtca
5581 tcatacaatc acttccttca ccagtttata gaaagtattt cttttaagat taagtgcctg
5641 catagttgca gttgcagttt gctcgccagt gcggtgatat ttaccgccg gtacactgga
5701 ataaccgagg ttacaagtct attgtttga gatgcgtcag ccgtttggag gaaaaaggat
5761 ctgaatgtac tgcccctacc ataaacgagg aaacattgca gacagcagtg gtcaaggcta
5821 ttaacgaact tttggctaac aaagaacct tctccaggc gttgcagaaa aacatagcta
5881 ctatacttaa tgaagaaaat gataatgcca ccaatgatat tgatagcaaa ttggaagaat
5941 tacaacaaca gcttcttatt caagcaaaat ccaagaatga ctatgaagat gtggctgatg
6001 aatctacca ccttcgagaa ttgaagcaaa atgcacttgt tgaaaatgca gagcgtgaag
6061 gaaaaaggca acgaatcgtc gaaatgactg atttctttaa tgaacaatcc tgtgagttag
6121 aggaatatga tgagcagtta gtaaggaggc ttatagaaaa agttacggta tttcatgata
6181 agttcgccgt tgaattcaaa tcaggagtgc agattgatgt agaagggtaa tctttagaaa
6241 gagaacagaa gaattatatt ggatttttaa agataatatg atataataaa acgacttga
6301 ggtggaagaa tgtataactt ttcttgctaa ttatatgat cataataaga tatttaaga
6361 aacggctata gaaccgtttg ttttgttatg caaattgcaa gaaagttaag tattctacac
6421 tcaataatac attacagtaa cttatgtta tgtataacaa aaggtaataa tagtatttgt

6481 ttttgagccg taagaattta ctttcttgcg gcttttaata tttgtaaaag aaaggaagat
6541 aaacgtgata gacaatgata ctatgtcatt catgacaaaa tccttgacaga gttggataac
6601 attatagagt aattaatgcc gaaaaccgac tttgcttata aaatTTTTat aatgtaaaag
6661 aggaagaaat atatgtcctt aataaatggt tcaaatctaa ctttttcata tgaaggaagt
6721 tatgacaata tttttgaaaa tgtaagtttt cagatagata cagattggaa actcggtttt
6781 attggaagaa acggacgcgg taaaactact ttcttaaatt tactgcttgg caaatatgcg
6841 tattccggca atataagttc tacagttaag tttgagtatt ttccttatga tgtggaagat
6901 aagagtctat atacaattga agtaatgaag agtatttcta cggaatgtat ggattgggag
6961 attttctcgtg aaatatcatt gcttgatggt caagaagatg ctttatatcg tccgtttaat
7021 acattgtcaa atgggtgagca aacgaaggtc cttcttgacg ctttatcct tacagcgagt
7081 tgtttcctgc ttattgatga acctacaaac catcttgaca tcgatgcacg taatgtagtg
7141 caaaactatt tgaaacgcaa gaaggggttt attttggtat ctcatgatag aagcttactt
7201 gatcaatgtg ttgaccatat actatctatc aataaaacga atatcgaaat ccaaaagga
7261 aatTTTactt cttgggtgga gaacaaaacg ttacaagata atTTTgaact ggcagaaaac
7321 aagaaaactcc ttaaagaaat aggaaggttg tcttatgcag caaaacgtag ttcaaactgg
7381 tcaataaaag tagaaaaaag taaatatgga acaacaaatt ctggttcaa actggataag
7441 ggttatgttg gacataaggc tgcaaaacg atgaaacgtg ccaaaaatat tgagtcaaga
7501 catcaggaag ccgTTTTaca aaaatcagaa ctgctccaca acattgaaca atatgatgac
7561 ttaaaaattt caccacttga atttcacaa gagtgcctaa tagaagcga tgatttatca
7621 ttgtcttatg gagataaaga agtatgcag aatcttaatt tcagagtcaa tattggtgat
7681 agagttgcca ttatcggaaa aaatgggagt ggtaagtcta gtatcctaaa attgattaat
7741 ggagatgata ttaaatttac cggaaatttt atgctagcaa gtggactaaa aatTTcttat
7801 atttcgaag atacttcata tttaaaaggt aatctatctg aatTTgccta taataataag
7861 atcgatgaaa ctctatTTaa aacgattcct cgtaaactgg atTTtaatag agagcagttt
7921 gataagaaca tgggtgattt tagtgctggt cagaaaaaga aagtactaat tgctaaaagc
7981 ctttTgTaaa gtgcacattt gtatatatgg gatgagccat tgaactatat tgatattttt
8041 tcacgtatcc aaattgaaaa aatgatTTtg gaatattgtc ctacactatt gttTgTggag
8101 catgatgatg cttttTgcaa taacattTgt acgaaaaata ttaatttagg tttgtagaga
8161 ttttgagttg ccacaataac taaaagatat ttacatgaaa gggTgaagaa atgtTaaaac
8221 aaaaagaatt aattgcaaac gttaagaatc ttactgagtc agatgaacga attacagctt
8281 gtatgatgta tggatcgttt accaaaggag aaggTgacca atactctgat atagagttct
8341 atatattttt gaaagatagt ataacctcga actttgattc atccaactgg ttgtttgacg
8401 tagctccgta cttgatgctt tataaaaaatg agtacggaac agaggtagtT atTTttgata
8461 atcttatacg tggggaattt catttctctt ctgaaaaaga tatgaacata atcccctcgt
8521 ttaaagattc aggttatatt cctgatacga aggctatgct tatttacgat gaaacagggc
8581 aattagaaaa ttatttatca gagataagtg gtgcaagacc aaatagactt actgaagaaa
8641 atgctaattt tttgtTgtgt aatTTctcta atctatggtt gatgggaatc aacgtTctaa
8701 aaagaggaga atatgctcgt tcattagaac tcttatcaca acttcaaaaa aatacactac
8761 aacttatacg tatggcagaa aaaaatgctg ataattggct aaacatgagt aaaaaccttg
8821 aaaaagaaat tagccttgaa aattataaaa aatTTgcaa gaccactgct cgattagata
8881 aggtagaatt atttgaagcc tataaaaatt ctttgctatt agttatggat ttgcaaagtc
8941 acctatttga acaatacaac ttaaagTta cacatgacat tttagaaaaga ttgttgaatt
9001 acattagtga ataggagagt aacgttatc acagtattgg gtactgaaaa ttaacagcat
9061 acctcagttt ttcaaaaaac agcgaagcct atggatatgt tcccgtctac cgatagtgca
9121 aaaagtgtcg tggatatggt tccgagaacg gacatacaca aatgacattc attctgtcct
9181 ctcaatccat attgaatgtg tgactgTTTT aagtaagtaa ggaaaacata aaaaaacggg
9241 ctctttgtca aatcggactg atgagacaaa tattgaagat gatgaatttg agaattttct
9301 caaattcatc atctTTTTtt agttattcaa ttgtgacaag gtcgTTTTatc ataaaaattc
9361 ttatcttcat attactaaaa gatttgaagc cataagatac tctTTTTaat atcttaatat
9421 gagtattttt agcttctatt tttccgTtag aatacttata cgttaagcat tacgaatccc
9481 ttcttcataa ttaatcagat tttcaatctt ctgTTTTaat agtggatcta aggtagtcgg
9541 taagtTcttt aataaatcaa aaaatgagtc tggatcttta tttctaaagt gataggTtaa
9601 taattgaaac acgccatagg cttctTTTTaa gtctgtagaa aatgataaaa gacgatcaat
9661 catcattgat tctgttagag ggggaaactt aggtgaagga aagcttctcc aatTTttata
9721 ttctgaaacta gaaacagtca tttgattctt taataggtat ttccaattta cttttagctt
9781 attggcttca gaacgctggg gattctttat taatgcttTc atttccctga ctctaaagtc
9841 attaaaagct tggtttaagt gtttaacgat atgaaaccta tcaatgacta aagctgcaca
9901 aggaaagatt tttttagTta actgaaaaata agccgcattc atatctgtca ctagaaattt
9961 tacctgttct cgtttctcct tgggagaacg attgaagtaa ttcattagtT tatcaagtct

10021 acgactagga agaacatcaa ccagttcacc ggtttcacca ttggcacaaa taaaactcat
 10081 tttatcttca taggtggcat gagatctgaa ttcacacacc attagaactt ttggaaaaga
 10141 gcgtgggtta agcgtttcag gtaaagtgtt ttcaacagat ttaaggacc ttataacggt
 10201 tgtgagtgat acatgacata tcttagcgat aacggtcatt gatatttttt gagttaataa
 10261 ttctagtatt ctaaagtca tgaatcgact aataaaacaa ttttcttcaa cgatagaaca
 10321 ttgagttgtc caatgttgat ggcagttttt acaaaaatat cgttgttttt ttagctttaa
 10381 aatagttgga atattttgat atgattccaa acgaattgtc acttcttttt tcccattttt
 10441 tacaatgggt ttcttttcat ctgcatcggt cgcatgagac tgacaatact tacaggccgt
 10501 aagcttaggt gagtaggtac cagtgataat taatgtgttc acacctttgt attttccttc
 10561 ttcaacacaa gttaaattta aatctttctt taattcgcaa catttttttg atatgattag
 10621 tcatgacatg tcgtcctttc tatttaagat tttggttggt actttaattt tactagatag
 10681 acgacatgct tttctactta aataaactaa aatagaactg atgaatcaaa aaatgattca
 10741 tcagttctat aaattataga gcctgaattt atccgcaaaa acaaatccg cacttagaat
 10801 atgatgataa gctgtaagga agataatcca gagcggtaca gtgtatgaag accacttcgt
 10861 catagtcttc aaatctggca tcgaaatgga aatataaaaa cccaaagtaa atagcccatg
 10921 actctacagt agagttgtgg gttttctttt gcttgctgat tataataata ttttaataac
 10981 tattgtgttt atcaatcaaa tggtttacia tattcttagc gtaaacttgg aggtgctgta
 11041 tgactacggc agaaatgatt aaagaactgt gtgagcaaat gaatataagt gtttccgaac
 11101 ttgctagacg tattggccag actccacaga atttcaataa aaaattacia cgagaaacag
 11161 taaccttggga tgagttgaag gccattgctg atgtgctagg tgtcaagttt gtgcaggcat
 11221 ttattttacc agatggagaa gaaataaaaa tatctaacga ataaaggagg atgtttatat
 11281 ggtaggtaat gttattcaaa tagtaacaga gaaattatca tctttgcctt ggttctgttg
 11341 caaagtaaaa aaatatagct aaccactaat ttatcatgtc agtgttcgtc taacttgcta
 11401 gcatgatgct aatttcgtgg catggcgaaa atccgtagat ctgaagagac ctgcggttct
 11461 ttttatatag agcgtaaata cattcaatac cttttaaagt attctttgct gtattgatac
 11521 tttgatacct tgtctttctt actttaatat gacggtgatc ttgctcaatg aggttattca
 11581 gatatttctga tgtacaatga cagtcaggtt taagttttaa agctttaatt attttagcca
 11641 ttgctacctt cgttgaaggt gcctgatctg taattacctt ttgaggttta ccaaattggt
 11701 taatgagacg tttgataaac gcatatgctg aatgattatc tcgttgctta cgcaacacaa
 11761 tatctaagt atgtccctct gcatcaatgg cacgatataa atagctccat tttctttta
 11821 ttttgatgta cgtctcatca atacgccatt tgtaataagc ttttttatgc tttttcttcc
 11881 aaatttgata caaaattggg gcatattctt gaaccaacg gtagactgtt gaatgatgaa
 11941 cgtttacacc acgttccctt aatatttcag atatatcacg ataactcaat gcatatctta
 12001 gatagtagct aacggctaca gtgataacat ccttgttaaa ttgtttatat ctgaaatagt
 12061 ccatacagaa gactcctttt tgttaaaatt atactataaa ttcaactttg caacagaacc

GenBank JQ312422.1

LOCUS JQ312422 7609 bp DNA circular BCT 11-APR-2012
 DEFINITION *Staphylococcus aureus* strain C2355 plasmid pUR-2355, complete
 sequence.
 ACCESSION JQ312422
 VERSION JQ312422
 KEYWORDS .
 SOURCE *Staphylococcus aureus*
 ORGANISM *Staphylococcus aureus*
 Bacteria; Firmicutes; Bacillales; *Staphylococcus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7609)
 AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E.,
 Aldea,M.J., Royo,G., Revillo,M.J., Zarazaga,M. and Torres,C.
 TITLE Genetic environment and localization of *lnu(A)*, *lnu(B)*, and *vga(A)*
 genes of MRSA and other staphylococci from animal and human origin
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 7609)
 AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E.,
 Aldea,M.J., Royo,G., Revillo,M.J., Zarazaga,M. and Torres,C.
 TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-DEC-2011) Area de Bioquimica y Biologia Molecular,
Universidad de La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja
26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..7609
/organism="Staphylococcus aureus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="C2355"
/isolation_source="pleural fluid"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:1280"
/plasmid="pUR-2355"
/country="Spain"
CDS 622..1086
/note="initiator replication protein"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="replication protein"
/protein_id="AFH57408"
/translation="MKERYGTVYKGGKEEFINKDSGEVIQFDKLYRAQTGGNFVKMYME
MFGQMLGMLMNRGEVMQYLFKDLNLSNNTVIKTVRELAKETNTSTKTVTETLKIMEKG
NIIKRKTGVMINPALLMRGDDNKKRYLLEFEQFNRENELEHALNEYESFK"
gene 2170..3738
/gene="vga(A)"
CDS 2170..3738
/gene="vga(A)"
/note="confers resistance to streptogramin A,
lincosamides
and pleuromutilins"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ABC transporter"
/protein_id="AFH57403"
/translation="MKILLEGLHIKHYVQDRLLLNNINRLKIYQNDRIGLIGKNGSGKT
TLLHILYKKIVPEEGIVKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLL
ADEPTTNDNNYIEKLEQDLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEIDEGRITEYKGN
YSNYVEQKELERHREELEYEKYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLSLSEGGIK
GAKPYFAGKQKLRKTVKSLETRLEKLESVEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGE
DVSGTIEGRVLWKAQSFSIRGGDKMAIIGSNGTGKTTFIKKIVHGNPGISLSPSVKIG
YFSQKIDTLELDKSILENVQSSSQNETLIRTIILARMHFFRDVYKPIISVLSGGERVK
VALTKVFLSEVNTLVLDEPTNFDMEAEAFESLLKEYNGSIFVSHDRKFIEKVATR
IMTIDNKEIKIFDGTYEQFKQAEKPTRNIKEDKLLLETKITEVLSRSLIEPSEELEQ
EFQNLINERNLDK"
CDS 4261..4353
/note="similar to pSHaeC02"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFH57404"
/translation="MIVVLFVMKYIVCPIIVGRVLYLLNQEHRK"
CDS complement(4467..5333)
/note="initiator replication protein"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="replication protein"
/protein_id="AFH57405"
/translation="MSGETVVYKNDMNLVPLRKFNNTEVNLFFTLCKNLKDKGNLTVN
VPFEELKELSNYYSHDKKLFIQDLEKFDYDKIFSLTYREETENVIRKFIKFTKVEIYKD
KEYVAIGVNPDLKHIINSLTSNFTKFELREMTLHKSTYSKHMFRILKQYKHTGVYKIK

IDDFRERLDIPNSYRMTNINQKVLAPIIKELGFI FNNLNINKIKAKRGRKIEWLEFTF
DAEKRIHNKRQPKMANVAQPKQYISREKTPKWLHERNQSNTTREMTEEEKALLKEQQQ
AFRQQLDLDWED"

gene complement(6279..7244)
/gene="rlx"
CDS complement(6279..7244)
/gene="rlx"
/note="relaxase/mobilization nuclease domain; similar to
Staphylococcus hominis SK119"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="relaxase protein"
/protein_id="AFH57406"
/translation="MATTKLSATKSTSRAINYAEKRAVEKSGLNCDVDYAKSSFKASR
ELYGKTDGNQGHVIIQSFKPDEVTPEQCNQLGLELAEKLPNHQVAVYTHNDTDHVHN
HIVINSIDLETGKKFNKQALRNVRNFNDEICREHGLSVPERDTAKLRYTQAEKALI
EKDQYSWKDDLREKIENAKDHTSDFKSFSEHLEKSGIEFKVRGKNVSYKPENVNKQVVR
GKTLGEDYDKGALEYEFERREREREKEESERDAVAAYTDQFEVDWDVAEHNTQLRKTR
IRRTEKTKQAHHQVSNRDTREPERTRETRTKTTHIEFDRGDEGFSR"

gene complement(7226..7609)
/gene="mobC"
CDS complement(7226..7609)
/gene="mobC"
/note="bacterial mobilization protein (MobC)"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="mobilization protein"
/protein_id="AFH57407"
/translation="MSEQNHFVASDETVGQNHKPNRKEPKQISFRVSESEYLKQSA
ETLNMSVPAFVKKAQGSRLVAPKFDKETRQSIKDL SRLGANANQIAKYCHQHQYNA
PNYSALERNINELRERLDDIWQQLN"

ORIGIN

1 acatcccacc acgcttttcta cgaaagatat tacttaatat aaatttagat tatatgataa
61 tctaaatttc atcaagtaat atagtgggtt ggcaagcact ggctttgcta gccactcaat
121 cgctatcgct cattcgtgac tgctcgctg cttggtgggg gcaagcccc aaagccccct
181 acaaaatgct agccatata caaaaaataa acgtaagcat aaacgcattc acttcttttc
241 tatataaata tgaacgaagt gaataagcgt cggaaaagca gcaaaaagtt tcctttttgc
301 tgttgagca tgggggttca gggggtgcag tatctgacgt caatgccgag cgatagcgag
361 ccgaagggtg gcatttacgt tagataacc cctgatatgc tccgacgctt tatatagaaa
421 agaagattcg actaggtaaa atcttaatac aggctgatat aacaacgttt ataaggaatt
481 ttgatgtagt acttttcttc ttgttttgta gtagttttct actacatacc cttattttg
541 aaacttttt ctactcaatg tgttgtatta tttttacaac ttatgtatta ttgagacata
601 aatataagt gaggtgtaac aatgaaagaa cgatatggaa cggtatataa agggaaagaa
661 gagtttataa ataaagactc aggagaagta atacagtttg ataagctata tagagcacia
721 acaggtggaa acttcgtaaa gatgtatatg gaaatgttg gacaaatggt gggcttaatg
781 aataaaagag gagaagtaat gcagtatctt ttaaagact taaacctatc aagcaatata
841 gtaataaaaa cagttcgaga actcgctaaa gaaacaaata caagtacaaa aactgtaaca
901 gaaaccctta aaattatgga aaaaggaaac attataaaaa gaaagactgg agttataatg
961 ataaaccag ccttattaat gcgtggagat gataataaaa aacgttatct cttactagaa
1021 ttcgagcaat tcaatagaga aaacgaatta gaacacgctt taaatgaata tgaaagtttt
1081 aagtaagttc attataacaa ggaagtgaag taatgaataa tataaatata cttgagagac
1141 gtttaaaaga cgctcagaga ataaaaaagt atctcataag gaataatgcc tcaaaaacta
1201 aaataagcga aataaagcgt atagagaact tcttagatgt agaattaaac aaagaaaaaa
1261 tagtagatac ttaaccaac gtatattttg gtaatcaaca aaatcaagat taaacctgca
1321 cggttaatgc agatcaaaag cttaacgcaa atgaaataga ttgacctccc gataacacca
1381 tgtgggtatc gggaggtcaa tctatgaaat gcgattaagc ttttttctaa tttgcataag
1441 cgtgcaggtt taaaacgcat aaaaagtata atgaaaaaaa gcatcattat actaacatta
1501 tcccctcatt atatcgctat tatactcaca ttataatgac ccaccttaat ctcgctttat
1561 tccaatttcc attttgagca gaaactttac tcatatgatt tggattggtt gtttaagttg

1621 aattaatcca acttaaaacc ggcaccaatc gccactgaag tggctatcat attcgccttt
1681 ctttctcaaa atgttttctc ggcataaatg cttgtttaag gtttggctag ccacatacgt
1741 ggtagcgacg cctgcttgtt ggggaatata cccaagcccc ttaggatttt tttctgcgaa
1801 aaaataagtg tctaattgct agccactgtt cattaagtaa tataaataaa ttaaaaaaat
1861 aatttgagtt gaacattgac atttatgttc tatttgttta aattgaattt aatagcgtaa
1921 aggaaagggt gaaccaacta catgattaac taatcctatt ttcaaaagta aacaattgaa
1981 agtgttttat ttacaaacag cgtttgattt gtgttgtttt caattgtact tttcaggata
2041 ggatgaaaat tctgtagtgt gctctaaaag tattttgtta gagttcatct atatagattt
2101 atgcctccta ttctgaatag attgggaggc ttttattgtc ttaaattact tataagagga
2161 tgagaaaata tgaaaatact gtttagagga cttcatataa aacattatgt tcaagatcgt
2221 ttattgttga acataaatcg cctaaagatt tatcagaatg atcgtattgg ttttaattgg
2281 aaaaatggaa gtggaaaaac aacgttactt cacatattat ataaaaaat tgtgctgtaa
2341 gaaggtattg taaaacaatt ttcacattgt gaacttattc ctcaattgaa gctcatagaa
2401 tcaactaaaa gtggtggtga agtaacacga aactatattc ggcaagcgtc tgataaaaaat
2461 ccagaactgc tatttagcaga tgaaccaaca actaacttag ataataacta tatagaaaaa
2521 ttagaacagg atttaaaaaa ttggcatgga gcatttatta tagtttcaca tgatcgcgct
2581 tttttagata acttgtgtac tactatatgg gaaattgacg aggggagaat aactgaatat
2641 aaggggaatt atagtaacta tgttgaacaa aaagaattag aaagacatcg agaagaatta
2701 gaatatgaaa aatatgaaa agaaaagaaa cgattggaaa aagctataaa tataaaaaaa
2761 cagaaagctc aacgagcaac taaaaaacg aaaaacttaa gtttatctga aggcaaaaata
2821 aaaggagcaa agccataact tgcaggtaag caaaagaagt tacgaaaaac tgtaaaatct
2881 ctagaacca gactagaaaa acttgaaagc gtcgaaaaga gaaacgaact tcctccactt
2941 aaaatggatt tagtgaact agaaagtgt aaaaatagaa ctataatcag tgggtgaagat
3001 gtctcgggta caattgaagg acgggtattg tggaaagcaa aaagttttag tattcgcgga
3061 ggagacaaga tggcaattat cggatcctaat ggtacaggaa agacaacggt tatttaaaaa
3121 attgtgcatg ggaatcctgg tatttcatta tgcctatctg tcaaaatcgg ttattttagc
3181 caaaaaatag atacattaga attagataag agtattttag aaaacggtca atcttcttca
3241 caacaaaatg aaactcctat tcgaactatt cttagctagaa tgcatttttt tagagatgat
3301 gtttataaac caataagtgt tttaagtggg ggagagcgag ttaaagtatg actaactaaa
3361 gtattcctaa gtgaagttaa tacgtttggt ttagatgaac caacaaactt tcttgatag
3421 gaagctatag aggcgtttga atctttgtta aaggaatata atggcagtat aatctttgta
3481 tctcacgacg gtaaatttat cgaaaaagta gccactcgaa taatgacaat tgataataaa
3541 gaaataaaaa tatttgatgg cacatatgaa caatttaaac aagctgaaaa gccacaagg
3601 aatattaaag aagataaaaa acttttactt gagacaaaaa ttacagaagt actcagtcga
3661 ttgagtattg aaccttcgga agaattagaa caagagtttc aaaacttaat aatgaaaaa
3721 agaaatttgg ataaataaat tacttttaaat ttaagcaata aagattatct ttgttgcctt
3781 tttattgaat aattgatggg taatatttat taagttagcg tattgcataa catatacaat
3841 tcaactacc ataagagtta attatgtaa ctaactcaa aggcttaaac gttgatataa
3901 caacgtttaa gccttttgct tatcattatc gtttatgcag gttttataca tcattgatct
3961 gatgcgtttt cagtcatttt cattgatgat cggtttgtat ctttattcag tttacacttg
4021 tgtaaattac acaagtgtaa actacacaaa tcattattca tgcggatact agttgactag
4081 taaataagta aacaagtaaa caagtttact tgtttacctg taattgatat atcgtattta
4141 gatgttacat acaatatgcy tgcacacagt atgcttgcat attgtatgca cgcatacagg
4201 tcatagggat tttgttataa ttggagagca cttccgtgca gaaaggagggt gccacatcta
4261 atgattgtcg ttctgtttgt tatgaagtat atcgtatgtc caattattgt tggacgtgtt
4321 ctttatttat taaatcaaga acataaacga taaaaaagaa accccagcat atgctttgg
4381 cggcatgctg gggttttcac atctaattgat gtatctgtct gtttgttaat ttcagtatat
4441 ctttcatagt atcttttcta aactttctaa tcttcccaat ctagtctaa ttgttgccta
4501 aatgcttgtt gttgttcttt taatagtgtc ttttcttctt cagtcatttc tctagtgtta
4561 ttactttgat ttcgttcatg tagccatttt ggcgttttct cagcactgat atattgtttg
4621 ggttgggcta cattcgccat tttgggttgt cgcttgttgt gaatgcgttt ctcagcgtca
4681 aaagtaaact ctaaccactc gattttacgt cctcttttcg cttttatttt attgatatta
4741 aggttattaa aatgaatcc taattcttta atgatagggg ctaatacttt ttgattaata
4801 tttgtcatac ggtagctatt aggaatatct agccgttctc taaaatcctc aattttaatt
4861 tttacatagc cagtatgttt atactgttta agtattctga acatagctt agaatatgta
4921 gatttaaggt gtgtcatttc tcgaagtcca aatttagtga agttactagt taatgaatta
4981 ataatatgtt taaatctgg attaacacca atagccacat actctttatc tttataaatt
5041 tctactttag taaaaagaat aaatcttcta ataacattct cagtttcttc tctatatgtt
5101 aaagagaaga ttttatcata gaatcttctc aaatcttgaa taaaagcctt tttatcatga

5161 ctatagtaat tacttaattc ttttaattct tcaaatggca cattaacagt caaattgcct
5221 ttatctttta atttattaca caaagtaaaa aatagattaa cttcgggtatt attaaatttt
5281 ctcaatggaa ctaaattcat atcattttta tatactactg tttctccact caattaactc
5341 cactccaatc taaaagaaac cttcacacaa taagattcc tattaacttt aattataaat
5401 acttataatc gctatattat aagtaataat aacataaaga aacctaatat aaaaaatagt
5461 tccttttagt taatgattgg ttgcctttaa catttcaaat cggttgtcgc tctaaggctc
5521 aaaagccacc taaaaagggt ttaaaaagat ttataaaaag atattaaaaa gttcggggca
5581 ttttgcccct cacaaattca aaagacaaaa aggaaagcaa ccacaaaagt ggttgctctt
5641 ttatttataa aaatcattaa gttattacc cttgatgcat tattccaatt gctttattga
5701 cattgagcct ctgaaccctt aataaacctt aaaactgtcg actcgtcggg tttatagctc
5761 acgctatacc gacattcgtc gaaacagttt aattaagggt tcttctcaat gcacaataaa
5821 ttttctcggc ataattgctt cctcataatt acaaaaagac ttcgaatttc tttctaattc
5881 attcataaag ataaataaat ccacctatcg caatgatata cggtaagcca taagcaatgt
5941 accaaaccaa cgtcataaag ccctcagacg ttttaacttt actagctatt gctttttgaa
6001 gtatatcgac atgtataaaa tccataaaat cactaccaat agtcatgact aacgtaaaaa
6061 gcataaagac taataacatt atgccaattc ctcgatacat gagtttaatt ttcttttggt
6121 atgcttcatg tgacgctctc acttcttgca acatacgttc attttcatca cgcactttat
6181 aaatatctct gccgattata ttagctaatt catcgggtatc gactttatcc aattttctct
6241 taagtataag agtaaagcta ttatggactt taacaccatt atctcgaaa atctcgtcgc
6301 cctctgtcaa attcgatgtg agttgttttt gttctttctc tcggtcgttc tggttctctt
6361 gtatctctgt tagatacttg atgatgact tgttttggtt tttcagttcg tctaattctt
6421 gtctttctaa gttgttctgt gttgtgctcg acggcgtccc agtcaacttc gaattggtct
6481 gtgtacgctg cgactgctgc tcgctctgat tccttttctt cttctcttcc tcgtcttcca
6541 aactcatatt ctaacgcccc cttgtcgtaa tcttcgcaa gtgttttgcc acgtaccat
6601 ttattgacgt tttcaggctt atatgagacg tttttgcctc tgactttaaa ctcgataccg
6661 gatttctcta aatgctctga aaagctctta aaatcacttg tatggctctt cgcattttca
6721 attttttctc gtaaatcatc tttccaagaa tattgatctt tttctattaa tgctttttca
6781 gcttgggtat atcttaattt tgcagatca cgttctggca cacttaaacc gtgttcccga
6841 caaatctcat cattaatatt tctgacatta cgtaaggctt gtttattggt gttgaatttc
6901 ttacctgtct cgagggtcaat cgaattaatc acgatatggt tgtgtacatg atccgatca
6961 ttatgtgtgt acacagccac ttgatgattg ggtgctagt tttcagcgcg ttctaaacct
7021 aactgattac attgttctgg agttacttca tcgggtttga atgattgaat aatcacatga
7081 ccttgattac catcagtttt gccatataac tcacgtgagg ctttaaaaact cgatttcgca
7141 taatccacat cacaatttaa gccgcttttt tcaacagcac gtttctcagc gtaattaatg
7201 gcacgtgacg ttgatttctg cgcacttaat ttagttgttg ccatatgtca tccaaccttt
7261 cacgtaattc attgatatta cgttctaatt gcctataatt cggagcgtta tattggtggt
7321 gatgacaata tttcgcaatt tgattggcat ttgcccctaa tcgacttaaa tctttcgcaa
7381 tcgattgtct cgtttcttta tcaaatitag gtgcgaccaa tcgactgcct tgtgcctttt
7441 tcttaacgaa agcaggcaca ctcataatta aagtttcagc cgactgcttc aactttaaat
7501 attcggattc gctcacacga aaactaattt gtttcggctc cttacggttg ggtttatggt
7561 tttgccaac agtttcgtcg cttagccaaa aatggttttg ttcgctcat

GenBank JQ861960.1

LOCUS JQ861960 7567 bp DNA circular BCT 14-JUN-2012
DEFINITION *Staphylococcus aureus* strain C4128 plasmid pUR4128, complete
sequence.
ACCESSION JQ861960
VERSION JQ861960
KEYWORDS .
SOURCE *Staphylococcus aureus*
ORGANISM *Staphylococcus aureus*
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; *Staphylococcus*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 7567)
AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ortega,C., Simon,C.,
Gomez-Sanz,E., Gomez,P., Zarazaga,M. and Torres,C.
TITLE Identification of novel vga(A)-carrying plasmids and Tn5406-like
transposon in MRSA and *S. epidermidis* from human and animal origin

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 7567)

AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ortega,C., Simon,C., Gomez-Sanz,E., Gomez,P., Zarazaga,M. and Torres,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (29-MAR-2012) Area de Bioquimica y Biologia Molecular, University of La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja 26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..7567
 /organism="Staphylococcus aureus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="C4128"
 /isolation_source="nasal sample"
 /host="pig"
 /db_xref="taxon:1280"
 /plasmid="pUR4128"
 /country="Spain"

CDS 622..1086
 /note="initiator replication protein"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="replication protein"
 /protein_id="AFM38052"
 /translation="MKERYGTVYKGKEEFINKDSGEVIQFDKLYRAQTGGNFVKMYME
 MFGQMLGMLNKRGEVMQYLFKDLNLSNNTVIKTVRELAKETNTSTKTVTETLKIMEKG
 NIIKRKTGVIMINPALLMRGDDNKKRYLLEFEQFNRENELEHALNEYESFK"

gene 2170..3738
 /gene="vga(A)"

CDS 2170..3738
 /gene="vga(A)"
 /note="confers resistance to streptogramin A, lincosamides
 and pleuromutilins"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="ABC transporter"
 /protein_id="AFM38053"
 /translation="MKILLEGLHIKHVYQDRLLLNINRLKIYQNDRIGLIGKNGSGKT
 TLLHILYKKIVPEEGIVKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLL
 ADEPTTNDNNYIEKLEQDLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEIDEGRITEYKGN
 YSNYVEQKELERHREELEYEKYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLSSSEGKIK
 GTKPYFASKQKLRKTVKSLETRLEKLERVEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRITIRGE
 DVSGTIEGRVLWKAKSFSIRGGDKMAIIGSNGTGKTTFFIKKIVHGNPGISLSPSVKIG
 YFSQKIDTLELDKSIENVSQSSSQNETLIRITILARMHFFRDDVYKPISVLSGGERVK
 VALTKVFLSEVNTLVLDEPTNFLDMEAIEAFESLLKEYNGSIFVSHDRKFIEKVATR
 IMTIDNKEIKIFDGTYEQFKQAEKPTRNIKEDKLLLETKITEVLSRSLSEEPSEELEQ
 EFQNLINERKRNLDK"

CDS 4261..4353
 /note="similar to pSHaeC02"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical protein"
 /protein_id="AFM38054"
 /translation="MIVVLFVMKYIVCPIIVGRVLYLLNQEHRK"

CDS complement(4467..5333)
 /note="initiator replication protein"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="replication protein"

```

        /protein_id="AFM38055"
        /translation="MSGETVYKNDMNLVPLRKFNNTEVNLFFTLCKNKLKDKGNLTVN
VPFEELKELSNYYSHDKLFIQDLEKIFYDKIFSLTYREETENVIRKFIILFTKVEIYKD
KEYVAIGVNPDLKHIINSLTSNFTKFELREMTHLKSTYSKHMFRILKQYKHTGYVKIK
IDDFRERLDIPNSYRMTNINQVLAPIIKELGFIFFNNLNINKIKAKRGRKIEWLEFTF
DAEKRIHNKRQPKMANVAQPKQYISREKTPKWLHERNQSNTTREMTEEEKALLKEQQQ
AFRQQLELDWED"
gene      complement(6279..7202)
          /gene="rlx"
CDS       complement(6279..7202)
          /gene="rlx"
          /note="relaxase/mobilization nuclease domain"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="relaxase protein"
          /protein_id="AFM38056"
          /translation="MATTKLSATKSTSRAINYAEKRAVEKSGLNCVDVYAKSSFKASR
ELYGKTDGNQGHVIIQSFKPDEVTPEQCNQLGLELAEKLAPNHQVAVYTHNDTDHVN
HIVINSIDLETGKKFNKQALRNVRNFNDEICREHGLSVPERDTAKLRYTQAEKALI
EKDQYSWKDDLREKIENAKDHTSDFKSFSEHLEKSGIEFKVRGKNVSYKPENVNKQVVR
GKTLGEDYDKGALEYEFEREREEREEKESERDAVEHNTEQLRKRIRRTEKTKQAHHQV
SNRDTRPERTRERTKTTTHIEFDRGDEGFSR"
gene      complement(7184..7567)
          /gene="mobC"
CDS       complement(7184..7567)
          /gene="mobC"
          /note="MobC"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="mobilization protein"
          /protein_id="AFM38057"
          /translation="MSEQNHFVASDETVGQNHKPNRKEPKQISFRVSESEYLKQSA
ETLNMSVPAFVKKKAQGSRLVAPKFDKETRQSIKDL SRLGANANQIAKYCHQHQYNA
PNYSALERNINELRERLDDIWQQLN"

```

ORIGIN

```

1  acatcccacc  acgcttttcta  cgaaagatat  tacttaatat  aaatttagat  tatatgataa
61  tctaaatttc  atcaagtaat  atagtggttt  ggcaagcact  ggctttgcta  gccactcaat
121 cgctatcgct  cattcgtgac  tgctcgctg  cttggtggg  gcaagcccc  aaagccccct
181 acaaaatgct  agccatata  caaaaaataa  acgtaagcat  aaacgcattc  acttcttttc
241 tatataaata  tgaacgaagt  gaataagcgt  cggaaaagca  gcaaaaagtt  tcctttttgc
301 tgttggagca  tgggggttca  ggggggtgca  tatctgacgt  caatgccgag  cgatagcgag
361 ccgaagggta  gcatttacgt  tagataacc  cctgatatgc  tccgacgctt  tatatagaaa
421 agaagattcg  actaggtaaa  atcttaatac  aggctgatat  aacaacgttt  ataaggaatt
481 ttgatgtagt  acttttcttc  ttgttttcta  gtagttttct  actacatacc  ccttatattg
541 aaactttttt  ctactcaatg  tgttgtatta  tttttacaac  ttatgtatta  ttgagacata
601 aatataaagt  gaggtgtaac  aatgaaagaa  cgatatggaa  cggatatata  agggaaagaa
661 gagtttataa  ataaagactc  aggagaagta  atacagtttg  ataagctata  tagagcacia
721 acaggtggaa  acttcgtaaa  gatgtatatg  gaaatgttg  gacaaatggt  gggcttaatg
781 aataaaagag  gagaagtaat  gcagtatctt  ttaaagact  taaacctatc  aagcaataca
841 gtaataaaaa  cagttcgaga  actcgctaaa  gaaacaaata  caagtacaaa  aactgtaaca
901 gaaaccctta  aaattatgga  aaaaggaaac  attataaaaa  gaaagactgg  agttataatg
961 ataaaccag  ccttattaat  gcgtggagat  gataataaaa  aacgttatct  ctactagaaa
1021 ttcgagcaat  tcaatagaga  aaacgaatta  gaacacgctt  taaatgaata  tgaaagtttt
1081 aagtaagttc  attataacaa  ggaagtgaag  taatgaataa  tataaataca  cttgagagac
1141 gtttaaaaaga  cgctcagaga  ataaaaaagt  atctcataag  gaataatgcc  tcaaaaacta
1201 aaataagcga  aataaagcgt  atagagaact  tcttagatgt  agaattaaac  aaagaaaaaa
1261 tagtagatac  ttaaccaaac  gtatattttg  gtaatcaaca  aatcaagat  taaacctgca
1321 cggttaatgc  agatcaaaag  ctaaacgcaa  atgaaataga  ttgacctccc  gataacacca
1381 tgtggttatc  gggaggtcaa  tctatgaaat  gcgatataag  ctttttctaa  tttgcataag

```

1441 cgtgcaggtt taaaacgcat aaaaagtata atgaaaaaaaa gcatcattat actaacatta
1501 tcccctcatt atatcgctat tatactcaca ttataatgac ccaccttaat ctcgctttat
1561 tccaatttcc attttgagca gaaactttac tcatatgatt tggattggtt gtttaagttgg
1621 aattaatcca acttaaaacc ggcaccaatc gccactgaag tggctatcat attcgccttt
1681 ctttctcaaa atgttttctc ggcataaatg cttgtttaag gtttggctag ccacatacgt
1741 ggtagecgac cctgcttgtt ggggaatatt cccaagcccc ttaggatttt tttctgcgaa
1801 aaaataagtg tctaattgct agccactggt cattaagtaa tataaataaa ttaaaaaaat
1861 aatttgagtt gaacattgac atttatttgc tatttgttta aattgaattt aatagcgtaa
1921 aggaaagggt gaaccaacta catgattaac taatcctatt ttcaaaagta aacaattgaa
1981 agtgttttat ttacaaacag cgtttgattt gtgttgtttt caattgtact tttcaggata
2041 ggatgaaaat tctgtagttg gctctaaaag tattttgtta gagttcatct atatagattt
2101 atgcctccta ttctgaatag attgggaggc ttttattgtc ttaaattact tataagagga
2161 tgagaaaata tgaaaatact gttagagga cttcatataa aacattatgt tcaagatcgt
2221 ttattgttga acataaatcg cctaaagatt tatcagaatg atcgtattgg ttttaattggt
2281 aaaaatggaa gtggaaaaac aacgttactt cacatattat ataaaaaat tgtgcctgaa
2341 gaaggtattg taaaacaatt ttcacattgt gaacttattc ctcaattgaa gctcatagaa
2401 tcaactaaaa gtggtggtga agtaacacga aactatattc ggcaagcgt tgaataaaa
2461 ccagaactgc tattagcaga tgaaccaaca actaacttag ataataacta tatagaaaaa
2521 tttagatcag atttaaaaaa ttggcatgga gcatttatta tagtttcaca tgcgcgct
2581 tttttagata acttatgtac tactatattg gaaattgacg aggggagaat aactgaatat
2641 aaggggaatt atagtaacta tgttgaacaa aaagaattag aaagacatcg agaagaatta
2701 gaatatgaaa aatatgaaaa agaaaagaaa cgattgaaa aagctataaa tataaaagaa
2761 cagaaagctc aacgagcaac taaaaaccg aaaaacttaa gttcatctga aggcaaaata
2821 aaaggaacaa agccatactt tgcaagtaag caaaagaagt tacgaaaaac tgtaaaatct
2881 ctagaaacca gactagaaaa acttgaaaag gtcgaaaaga gaaacgaact tcctccactt
2941 aaaatggatt tagtgaactt agaaagtgta aaaaatagaa ctataatcag tgggtgaagat
3001 gtctcgggta caattgaagg acgggtattg tggaaagcaa aaagttttag tattcgcgga
3061 ggagacaaga tggcaattat cggatcctaat ggtacaggaa agacaacggt tattaaaaaa
3121 attgtgcatg gaaatcctgg tatttcatta tgcctatctg tcaaaatcgg ttttttagc
3181 caaaaaatag atacattaga attagataag agcatttttag aaaatgttca atcttcttca
3241 caacaaaatg aaactcctat tgcgaactatt cttagctagaa tgcatttttt tagagatgat
3301 gtttataaac caataagtgt cttaagtggg ggagagcgag ttaaagtagc actaactaaa
3361 gtattcctaa gtgaagttaa tacggttggta ctagatgaac caacaaactt tcttgatatg
3421 gaagctatag aggcggttga atctttgtta aaggaatata atggcagtat aatttttgt
3481 tctcacgacg gtaaatctat cgaaaaagta gccactcgaa taatgacaat tgataataaa
3541 gaaataaaaa tatttgatgg cacatatgaa caatttaaac aagctgaaaa gccacaagg
3601 aatattaaag aagataaaaa acttttactt gagacaaaaa ttacagaagt actcagtcga
3661 ttgagtattg aaccttcgga agaattagaa caagagtttc aaaacttaat aatgaaaaa
3721 agaaatctag ataaataaat tacttttaaat ttaagcaata aagattatct ttgttgcctt
3781 tttattgaat aattgatggg taatatttat taagttagcg tattgcataa catatacaat
3841 tcaactacc ataagagtta attatgtaa ctaactcaaa aggccttaac gttgatataa
3901 caacgtttaa gccttttgc taccattatc gtttatgcag gttttataca tcattgatct
3961 gatgcgtttt cagtcatttt cattgatgat cggtttgtat ctttattcag tttacacttg
4021 tgtaaattac acaagtgtaa actacacaaa tcattattca tgcggatact agttgactag
4081 taataagta aacaagtaaa caagtttact tgtttacctg taattgatat atcgtattta
4141 gatgttaccat acaatagcgc tgcacacagc atgcttgcat attgtatgca cgcatacagg
4201 tcatagggat tttgttataa ttggagagca cttcctgca gaaaggagggt gccacatcta
4261 atgattgtcg ttctgtttgt tatgaagat atcgtatgtc caattattgt tggacgtggt
4321 ctttatttat taaatcaaga acataaacga taaaaaagaa accccagcat atgctttgggt
4381 cggcatgctg gggttttcac atctaattgat gtatctgtct gtttgttaat ttcagtatat
4441 ctttcatagt atcttttcta aactttctaa tcttcccaat ctagtcttaa ttgttgccta
4501 aatgcttgtt gttgttcttt taatagtgct ttttcttctt cagtcatttc tctagttgta
4561 ttactttgat ttcgttcatg tagccatttt ggcggtttct cagcactgat atattgtttg
4621 ggttgggcta cattcgccat tttgggttgt cgcttgttgt gaatgcgctt ctcagcgtca
4681 aaagtaaaact ctaaccactc gattttacgt cctctttctg cttttatttt attgatatta
4741 aggttattaa aatgaatcc taattcttta atgatagggg ctaatacttt ttgattaata
4801 tttgtcatal ggtagctatt aggaatatct agccgttctc taaaatcact aattttaatt
4861 tttacatagc cagtatgttt atactgctta agtattctga acatagctt agaatatgta
4921 gatttaaggt gtgtcatttc tcgaagttca aatttagtga agttactagt taatgaatta

4981 ataatatggt ttaaatctgg attaacacca atagccacat actctttatc tttataaatt
 5041 tctacttttag taaaaagaat aaatthttcta ataacattct cagttttctc tctatatggt
 5101 aaagagaaga ttttatcata gaatthttct aaatcttgaa taaaaagctt tttatcatga
 5161 ctatagtaat tacttaattc tthtaattct tcaaatggca cattaacagt caaattgctt
 5221 ttatctthta atthattaca caaagtaaaa aatagattaa ctctggattt attaaatttt
 5281 ctcaatggaa ctaaattcat atcattthta tatactactg tttctccact caattaactc
 5341 cactccaatc taaaagaaac ctccacacaa taaagattcc tattaacttt aattataaat
 5401 acttataatc gctatattat aagtaataat aacataaaga aacctaatat aaaaaatagt
 5461 tcctthtagt taatgattgg ttgcctthaa catttcaaat ccgttgtcgc tctaaggctc
 5521 aaaagccacc taaaaagggt ttaaaaagat ttataaaaag atattaaaaa gttcggggca
 5581 tthtgccctc cacaaattca aaagacaaaa aggaaagcaa ccacaaaagt ggttgctctt
 5641 ttattthata aaatcattaa gttattacc cttgatgcat tattccaatt gctthattga
 5701 cattgagcct ctgaaccctt aataaacctt aaaactgtcg actcgtcggg tttatagctc
 5761 acgctatacc gacattcgtc gaaacagttt aattaagggt tcttctcaat gcacaataaa
 5821 tthtctcggc ataattgctt cctcataatt acaaaaagac ttcgaatttc tttctaattc
 5881 attcataaag ataaataaat ccacctatcg caatgatata cggtaagcca taagcaatgt
 5941 accaaaccaa cgtcataaag cctcaaacg tthtaattct actagctatt gctthttgaa
 6001 gtataatcgc atgtataaaa tccataaaat cactaccaat agtcatgact aacgtaaaaa
 6061 gcataaagac taataacatt atgccaattc ctcgatacat gaggthtaatt ttctthtggg
 6121 atgctthcatg tgacgctctc acttcttgca acatacgttc atthtcatca cgcacttht
 6181 aaatatctct gccgattata tttagtaatt catcgggtatc gactthtacc aatthttctt
 6241 taagtatatg agtaaagcta ttatggactt taacaccatt atctcgaaaa tccttcgtcg
 6301 cctctgtcaa atctgatgtg agttgtthtt gttctthtct tcgtgcgttc tggttctctt
 6361 gtatctctgt tagatacttg atgatgagct tggthtthtt tthcagttcg tctaattctt
 6421 gtctthtctaa gttgtthtct gttgtgttcg acggcgtctc gctctgattc ctthtctctt
 6481 tctctthtct gtctthtcaa ctcatattct aacgccccct tgcgtaatc ttcgccaagt
 6541 gthttgcccac gtaccattt attgacgttt tcaggcttat atgagacgtt tthgctctg
 6601 actthtaact cgataccgga tthtctctaaa tgctctgaaa agctctthaa atcacttgta
 6661 tgggtctthcg cattthtcaat tthtctctgt aaatcatctt tccaagaata ttgatcttht
 6721 tctattaatg ctthttcagc ttgggtatat cttaattthg cagtatcacg tctggcaca
 6781 cttaaacctg gttcccagca aatctcatca ttaaaatttc tgacattacg taaggcttgt
 6841 ttattgttht tgaattthct acctgtctcg aggtcaatcg aattaatcac gatatggtg
 6901 tgtacatgat ccgtatcatt atgtgtgtac acagccactt gatgattggg tgctagthtt
 6961 tcagcgagtt ctaaacctaa ctgattacat tgttctggag ttacttcatc gggthtgaat
 7021 gattgaataa tccatgacc ttgattacca tcagthttgc catataactc acgtgaggct
 7081 ttaaaactcg atthtgcata atccacatca caatttaagc cgctthtttc aacagcacgt
 7141 thtctcagct aattaatggc acgtgacgtt gatttctcgc cacttaattt agttgttgc
 7201 atatgtcatc caacctthca cgtaattcat tgatattacg thtctaatgc ctataattcg
 7261 gagcgttata ttgggttga tgacaatatt tcgcaatttg attggcattt gccctaatc
 7321 gactthaatc tthtgcgaatc gattgtctcg tthtcttht ccaatttaggt gcgaccaatc
 7381 gactgccttg tgcctthttc ttaacgaaag caggcacact catattthaa gthttagccg
 7441 actgctthca ctthaaatat tcggattcgc tcacacgaaa actaatttgt ttcggctctt
 7501 tacgggtggg thtatgtht tgcccaacag tthtctcgtc agccacaaaa tggthttggt
 7561 cgctcat

GenBank JQ312423.1

LOCUS JQ312423 7209 bp DNA circular BCT 11-APR-2012
 DEFINITION *Staphylococcus epidermidis* strain C3036 plasmid pUR3036,
 complete sequence.
 ACCESSION JQ312423
 VERSION JQ312423
 KEYWORDS .
 SOURCE *Staphylococcus epidermidis*
 ORGANISM *Staphylococcus epidermidis*
 Bacteria; Firmicutes; Bacillales; *Staphylococcus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7209)

AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E., Aldea,M.J., Revillo,G., Zarazaga,M. and Torres,C.

TITLE Genetic environment and localization of lnu(A), lnu(B), and vga(A) genes of MRSA and other staphylococci from animal and human origin

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 7209)

AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E., Aldea,M.J., Revillo,G., Zarazaga,M. and Torres,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-DEC-2011) Area de Bioquimica y Biologia Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja 26006, Spain

FEATURES

Location/Qualifiers

source 1..7209
/organism="Staphylococcus epidermidis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="C3036"
/isolation_source="nasal sample"
/host="cat"
/db_xref="taxon:1282"
/plasmid="pUR3036"
/country="Spain"

gene 552..2120
/gene="vga(A)"

CDS 552..2120
/gene="vga(A)"
/note="confers resistance to streptogramin A, lincosamides and pleuromutilins"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ABC transporter"
/protein_id="AFH57409"
/translation="MKIMLEGLHIKHYVQDRLLLNNINRLKIYQNDRIGLVGKNGNGKT
TLLHILYKKIVPEEGIVKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPELLL
ADEPTTNDNNYIEKLEQDLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEIDEGRITEYKGN
YSNYVEQKELERHREELEYEKYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLSSSEKIK
GTKPYFASKQKLRKTVKSLETRLEKLERVEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRTIIRGE
DVSGTIEGRVLWKAQSFSIRGGDKMAIIGSNGTGKTTFIKKIVHGNGPISLSPSVKIG
YFSQKIDTLELDKSILENVQSSSQNETLIRTIILARMHFFRDVYKPI SVLSGGERVK
VALTKVFLSEVNTLVLDEPTNFDMEAI EAFESLLKEYNGSIFVSHDRKFIEKVATR
IMTIDNKEIKIFDGTYEQFKAEKPTRNIKEDKLLLETKITEVLSRSLIEPSEELEQ
EFQNLINERNLDK"

CDS complement(2524..2721)
/note="similar to SE_p610 of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFH57410"
/translation="MKRQLLQNYILKRKYISNFTKSIRKDILKVTNSRYIIVCENPQR
AGWGFLFTYALVVIDKEHNQQ"

CDS 2778..3389
/note="similar to SE_p609 of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="hypothetical protein"
/protein_id="AFH57411"

```

/translacion="MSMNKSKVAEIRKQKSLTQENLAEKAYVTVRTIQRMEAGEEVSS
ETLKSVSINALDVTVNELFESISSSDKEEEIMEISKEQQKQFNRYKKNELFTIKLITFSF
IFVFLGLFGIFVVGELNGLEQNIYRIIWIFALFLSLAIMYYFLNVFISKKLDDKKYPMTI
GMKNRNRKNEPVKNGWDFMARYWWIVFPIGGFLSWLIPELTGK"
gene      complement(3437..4261)
          /gene="rep"
CDS       complement(3437..4261)
          /gene="rep"
          /note="initiator replication protein; similar to SE_p608
of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="replication protein"
          /protein_id="AFH57412"
/translacion="MNLVPLRKFNNTEVNLFFTLCNKLKDKGNLTVNVPFEELKELSN
YYSHDKKLFIQDLEKFDYKVFSLTYREETENVIRKFIKVEIYKDKKEYVAIGVNPD
LEHIINSLTSNFTKFKELKEMTHLKSTYSKHMFRILKQYKHTGYVKIKIDDFRERLDIP
NSYRMTNINQKVLAPIIKELGFIFNNLNINKIKAKKGRKIEWLEFTFDAEKRIHNKRQ
PQMANIDKSRQYISREKTPRWLEERTYKQIKNEYDPQLEKERKAFLKQLDLDWED"
CDS       4836..5036
          /note="similar to SE_p607of Staphylococcus epidermidis
ATCC 12228"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="hypothetical protein"
          /protein_id="AFH57413"
/translacion="MLNKFSRHKRCYSSFSISFTTFNIGVISNDKINADSKIRKIFV
PSKNIKLTTYPKRQNTIKKQIK"
gene      complement(5139..5948)
          /gene="mob"
CDS       complement(5139..5948)
          /gene="mob"
          /note="similar to SE_p606 of Staphylococcus epidermidis
ATCC 12228"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="mobilization protein"
          /protein_id="AFH57414"
/translacion="MALKDKYNDDNNKNINQTRTSSQNDQLQTVMNQLNEIQASLNQI
GTNSPKTQMSLSVADKLQDQLLMLKRLLEEIEKREYERNQRHDQLLTSIETTASNFNQ
ATDFTQKRIFISAARHYIERINSDNLKQDFHTAIQKELEDVKTDTQNVVKEVQNNQSEL
RQANNNYKKMIDERMKSNAIVIKQYDQVIHRLTKGITAMFFIVALVMVAFLVISPLGD
WLGVQHFYEWLNHVLTGHSAWRYFMLVFPYILFVGLIYAILKAYERL"
gene      complement(5647..6657)
          /gene="rlx"
CDS       complement(5647..6657)
          /gene="rlx"
          /note="similar to SE_p605 of Staphylococcus epidermidis
ATCC 12228"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="relaxase protein"
          /protein_id="AFH57415"
/translacion="MATTKLSATKSTSRAINYAEKRAVEKSGLNCDVDYAKSSFKAAR
ELYGKTDGNQGHVIIQSFQPGVTPPEQCNQLGLALAEKLVPNHQVAVYTHADTNHVHN
HIVLNSIDLNTGKKFNNNKQALRDVRAFNDVFCRAQGLSVPEKDTARLRYTQTEKAIA
DPNTTSTAQYSWKDDIREAIDQSTATNMEEFQKHLNQHGITIERVTPKSITYRHLAEN
KKVRGRKLGEDYNKGGIQHGFERQIQRRQQKHKSDTNFQPKRSTSNRHESTERDGTG
TQSDWDQFAQDTNELERRRQAAESARLVDEKARRDREKRVREKPTSRPIINIDRDHGL

```

```

EL"
gene      complement(6644..6844)
          /gene="mob1"
CDS       complement(6644..6844)
          /gene="mob1"
          /note="similar to SE_p604 of Staphylococcus epidermidis
          ATCC 12228"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="mobilization protein"
          /protein_id="AFH57416"
          /translation="MEHDPKIKMIVSAILFVMCLMILFYFIFFDQFPVILCFSLLTF
ITGIDL YISYK KKKKARDTNGNN"
gene      complement(6823..7209)
          /gene="mobC"
CDS       complement(6823..7209)
          /gene="mobC"
          /note="similar to SE_p610 of Staphylococcus epidermidis
          ATCC 12228"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="mobilization protein"
          /protein_id="AFH57417"
          /translation="MSEQNKFVASDETVGRNRKPNRKAPKQISFRVSESEYLK LQOSA
ETLNMSVPAFVKKKAQGARLVSPKLDQATRQSVAKDLSMLGANANQIAKYCNQHQHEA
PNYEALERNISELRERLDEIWNMIQK"

```

ORIGIN

```

1  tattcccccc acgcttttcta cgaaagataa cgccttttctt aaattttact ttataagata
61  aagcaaaatt tatcaagtcg ttaagtgggt tggcaagcat tggcctttgct agccactaac
121 gtggcagacg cgccagcttg ttggggatta tcccccaagcc ccttatgttt tttgcttacg
181 caaaaaagag tggctaattg ctagccattg ttcattaagt aatacaaaata aattgaagaa
241 ataatttggg ttgaacattg acattttattt gctattttgtt taagttgaat ttaatacgat
301 aagggaaagg gtgaaccaac tacatgatta actaatccta ttttcaaaag gaaacaattg
361 aaagtatttt atttacaaat agcgttttgat ttgtgtttgtt ttcaattgta cttttcagga
421 taggatgaaa attctgtagt tggctctaaa agtattttgt tagagttcat ctatatagat
481 ttatgcctcc tattctgaat agattaggag gctttttattg tcttcaatta cttatgagag
541 gatgacgaaa tatgaaaata atgtttagagg gacttcatat aaaacattat gttcaagatc
601 gttttattgt gaacataaat cgcctaaaga tttatcagaa tgatcgtatt ggtttagttg
661 gtaaaaatgg aaatggaaaa acaacgttac ttcacatatt atataaaaaa attgtgcctg
721 aagaaggtat tgtaaaacaa ttttcacatt gtgaacttat tcctcaattg aagctcatag
781 aatcaactaa aagtgggtgt gaagtaacac gaaactatat tcggcaagcg cttgataaaa
841 atccagaact gctattagca gatgaaccaa caactaactt agataataac tatatagaaa
901 aattagaaca ggatttaaaa aattggcatg gagcatttat tatagtttca catgatcgcg
961 cttttttaga taacttatgt actactatat gggaaattga cgaggggaga ataactgaat
1021 ataaggggaa ttatagtaac tatgttgaac aaaaagaatt agaaagacat cgagaagaat
1081 tagaatatga aaaatagtaa aaagaaaaga aacgattgga aaaagctata aatataaaaag
1141 aacagaaaagc tcaacgagca actaaaaaac cgaaaaactt aagttcatct gaaggcaaaa
1201 taaaaggaac aaagccatac tttgcaagta agcaaaaagaa gttacgaaaa actgtaaaat
1261 ctctagaaac cagactagaa aaacttgaaa gggtcgaaaa gagaaacgaa cttcctccac
1321 ttaaaatgga tttagtgaac ttagaaagtg taaaaaatag aactataata cgtgggtgaag
1381 atgtctcggg tacaattgaa ggacgggtat tgtggaaagc aaaaagtttt agtattcgcg
1441 gaggagacaa gatggcaatt atcggatcta atggtacagg aaagacaacg tttattaaaa
1501 aaattgtgca tggaaatcct ggtatttcat tatcgccatc tgtcaaaatc ggttatttta
1561 gccaaaaaat agatacatta gaattagata agagcatttt agaaaatgtt caatcttctt
1621 cacaacaaaa tgaaactctt attcgaacta ttctagctag aatgcatttt tttagagatg
1681 atgtttataa accaataagt gtcttaagtg gtggagagcg agttaaagta gcactaacta
1741 aagtattctt aagtgaagtt aatcgtttgg tactagatga accaacaac tttcttgata
1801 tggaagctat agaggcgttt gaatctttgt taaaggaata taatggcagt ataatttttg
1861 tatctcacga tcgtaaattt atcgaaaaag tagccactcg aataatgaca attgataata

```

1921 aagaaataaa aatatttgat ggcacatatg aacaatttaa acaagctgaa aagccaacaa
1981 ggaatattaa agaagataaa aaacttttac ttgagacaaa aattacagaa gtactcagtc
2041 gattgagtat tgaaccttcg gaagaattag aacaagagtt tcaaaactta ataaatgaaa
2101 aaagaaattt agataaataa attaccttaa atttaagcaa taaagattat tcttgtgtgc
2161 tttttattga atcattgatg ggtaaatattt attaagttag tgtattgcat aacctataca
2221 attctactac ctataatttg taattatggt aactcatcaa agaggcttaa acgctgtgaa
2281 atcaacgttt aagccttttc tttatgatta tcgttttatc atcttttata catcgttggt
2341 ctcacgtggt ttcattcttt ttcattaagt gaacttttgt atctttatc acaatttcac
2401 gtgataacac accgttttta attgtagttt tttgtttatac tggaaaagca cttccgtgca
2461 caaaggaggt gtcacataca atgataatct tgctatttgt actagataag ctcatttttc
2521 caattattgt tggttatggt ctttatctat tacaacaaga gcataagtaa aaagaaaccc
2581 ccagccggca cgctgggggt tttcacatac aatgatatac ctgctatttg ttactttcag
2641 tatatccttt cttatgcttt ttgtaaaatt agatatatac tttcttttaa gaatataatt
2701 ttgaagtaac tgtcgtttca ttgtcgccca tctgtcggca atttttcgtg ttcatttttt
2761 tagttgagga gtagtttatg agtatgaaca aatcaaaaagt tgcagaaatt agaaaaacaa
2821 aatcgttaac tcaagaaaat ttagcagaaa aggccttatgt aacagtaaga acaattcaaa
2881 gaatggaggc tggagaagaa gttagtagtg aaacacttaa aagtgtctca aacgcattag
2941 atgtgacagt caatgaacta ttcgaatcta tctcgtcttc tgataaggag gaggaaataa
3001 tggaaataat taaagaacaa caaaagcagt ttaattatcg taaaaatgaa ctttttacta
3061 ttaaatatc aacatttagt tttatttttg tgtttttagg actatttggaa atcttttag
3121 tgagagtttaa cggtttagaa caaaatattt accgcatcat ttggattttc gctttatttt
3181 tgagccttagc aataatgtag tattttttaa atgtttttat ttcaaaaaaa ttagataaaa
3241 aatattcctat gactattgga atgaaaaata gaaatagaaa aatgaacct gtaaaaaatg
3301 gctgggattt tatggctaga tattgggtgga ttgtttttcc tattggaggy tttctaagt
3361 ggctaattcc tgaattaaaca ggaaaaataa atacaaaaca aaagatcttt agcaaggggg
3421 ctaaagatct tttgttttaa tcttcccagt ctaattgaag ttgttttaaa aatgcttttc
3481 gctctttttc taattgtgga tcatattcat tttttatttg tttttcataa gtacgttctt
3541 ctaaccatct cggcgttttt tcccgactta tatattgtcg tgacttatct atattcgcca
3601 tttgtggctg tcgttttattg tgaatgcggt tctcagcgtc aaaagtaaac tctaaccatt
3661 caatttttac tctttttttt gccttttattt tattgatatt aaggttatta aaaataaagc
3721 ctaattcttt aatgataggg gctaataactt tttgattaat atttgtcata cggtaactat
3781 taggaatctc cagccgttct ctaaaatcat caattttaat ttttcatag ccagtatggt
3841 tatactgctt aagtattctg aacatattgct tagaatatgt agatttaagg tgtgtcattt
3901 ctttaagttc aaatttagtg aagttactag ttaatgaatt aataatattg tctaaatctg
3961 gattaacacc aatagccaca tactctttat ctttataaat ttctacttta gtaaaaagaa
4021 taaattttct aataacattc tcagtttctt ctctatatgt taaagagaaa actttgtcat
4081 agaatttttc taaatcttga ataaaaagct ttttatcatg actatagtaa ttacttaatt
4141 cttttaattc ttcaaagggc acattaacag tcaaattgcc tttatctttt aatttattac
4201 acaaagtaaa aaatagatta acttcagtat tattaattt tctcagtgga actaaattca
4261 tatcattttt atatactact gtttctccac tcaactaact cactccaat ctaaaagaaa
4321 cctatataga ataaagattc ctattaactt taattgtaaa tacttataat cactatgta
4381 taacaataa taacataaag aaaccttaata taaaaaaagt ttctttagt taatgattgg
4441 ttgcctttag tttaatgatt gggtgcctt agtttaatga ttgggtgcct ttagtttaat
4501 gattgggtgc ctttaacatt tcaaatctat tgcactccta aggatcaaat gactcctaaa
4561 aaggttttta aaagatttat aaaaagatat taaaaagtgc ggggcaattt gccctcaca
4621 aattcaaaag acaaaaagga aaccaccac atttgtggtg gggtttttatt atttaaaaaa
4681 gtaataagt atataacttt aatgcattat tccaattgct ttattgacat tgagcctctg
4741 aacccttaat aaaccctaaa actgtcgact cgctcggttc atagctcaca ctatcccagc
4801 attcgtcgaa acagtttaat taagggttct tctcaatgct caataaattt tctcggcata
4861 agcgcagtg ctattcttca ttttccatat cttttacaac ctttaataatc ggtgtgatta
4921 gtaatgataa aataaatgct gattctaaaa tcagaaaaat atttgttcct tcaaaaaata
4981 ttaagttgac cacatatcca aaaagacaaa atacaataaa aaaacaaata aagtgaacaa
5041 tagaattcaa ggcgagcact cttttttggt ttctacgcta ttttaagctt gatatagctt
5101 cttcattaaa caaaaggtaa ttttctattt attttgtatt aaagacgctc atatgctttt
5161 aaaatggcat atataagcac tccaaataaa atataaggta caagatagaa aacaagcatg
5221 aaataacgcc atgctgaatg ccccgtttta agcacgtggt tcagccattc gtaaaaatgt
5281 tggacgccta accagtcacc taagggactt ataactaaa aggcgacat cactaaggca
5341 acgataaaaa acatggctgt gatgccttta gttaacgat gtatgacttg atcatattgt
5401 ttaatcacta ttgcgttgct cttcacaagt tcatcaatca tttttttata attattattg

5461 gcttgctcga gttcggattg gttgttttga acttccttaa ctacgttttg tgtgtctggt
 5521 ttgacatcct ctaattcttt ttgtatagct gtgtgaaaat cttgttttaa attatcgcta
 5581 ttaatccggt caatataatg tcttgccgcg cttataaaac gcttttgtgt gaagtcctgtg
 5641 gcttgattaa agttcggaggc cgtgggtctcg atcgatgtta ataattggtc gtgacgttg
 5701 tttctctcgt actctctttt ctcgatctct tcgagccttt tcatcaacaa gtcttgctga
 5761 ttctgcagct tgctggcgac gctcaagctc atttgtgtct tgggccaatt ggtcccaatc
 5821 tgattgagtg acgcctgtat ctcgttcagt tgattcatga cggtttgaag ttgatcgttt
 5881 tggctggaag ttcgtgtctg atttatgttt ttgttgttgt cgtcgttcta tttgtctttc
 5941 aaagccatgt tggatgcctc ctttattgta atcttcgccc aatttacgcc cgcgtacttt
 6001 tttattttca gctaaatgcc gataggtaat gcttttgggg gtaacacgtt caatcgtaat
 6061 accatggtga ttcagatgtt tttgaaatc ttccatattt gtcgctgttg attggtcaat
 6121 tgcctcacgt atgtcatcct tccatgagta ttgtgctgtc gacgtcgtgt tagggctggc
 6181 aatcgctttt tctgtttggg tataacgtaa gcgtgctgtg tctttctcag gcacgctcaa
 6241 cccctgtgct cgacaaacct cgtcgttgaa cgtctcaca tcgctaggg cttgtttatt
 6301 attgtttaa tctttacctg tattgaggtc aattgaatta agtacaatat gattgtgtac
 6361 atggtttgta tctgcatgcg tatagacggc gacttgatga ttggggacga gtttttcagc
 6421 aagcgcta cctaattggt tacattgttc gggcgctact tcgccaggtt gaaacgattg
 6481 gataatgaca tgcccttgat taccgtctgt tttgccatac aattcacgag cggctttaa
 6541 actagattg gcatagcca cgtcacaatt taagccactt ttctcaacgg cacgttttc
 6601 agcgaattg atggcccgtg atggtgatt agtcgcactt aatttagtgy ttgccattg
 6661 taccacgcg tttttcttt ttatatgata tatataaatc aatacctgtg ataaaagta
 6721 aaagtgaaaa acacaaaatc accgaaatt gtggatcaaa gaaaataaaa taaaacaata
 6781 tcattaaaca catcacaatc aaaatggcac ttacaatcat ttttatttt ggatcatggt
 6841 ccatatctca tctaacctt cacgtaatc actaatgta cgttctaag cttcgtagtt
 6901 cggtgcttcg tgttgatggt ggttgcaata tttcgcaatc tgattggcat ttgcacctaa
 6961 catactcaaa tcttttgcta ccgattgtcg tgttgcttga tccaatttgg gtgataccaa
 7021 tcgggcgctc tgtgcctttt tcttaacgaa agcaggcaca ctcatattta aagtttcagc
 7081 tgattgttgt aactttaaat attcggattc gctcacacga aaactgattt gtttcggcgc
 7141 cttacggttg ggtttacggt ttcgccaac agtttcgctc ctagccacaa atttattttg
 7201 ttcgctcat

GenBank JQ312424.1

LOCUS JQ312424 7082 bp DNA circular BCT 11-APR-2012
 DEFINITION *Staphylococcus epidermidis* strain C3937 plasmid pUR3937, complete sequence.
 ACCESSION JQ312424
 VERSION JQ312424
 KEYWORDS .
 SOURCE *Staphylococcus epidermidis*
 ORGANISM *Staphylococcus epidermidis*
 Bacteria; Firmicutes; Bacillales; *Staphylococcus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7082)
 AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E., Aldea,M.J., Royo,G., Revillo,M.J., Zarazaga,M. and Torres,C.
 TITLE Genetic environment and localization of *lnu(A)*, *lnu(B)*, and *vga(A)* genes of MRSA and other staphylococci from animal and human origin
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 7082)
 AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E., Aldea,M.J., Royo,G., Revillo,M.J., Zarazaga,M. and Torres,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-DEC-2011) Area de Bioquimica y Biologia Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja 26006, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..7082
 /organism="Staphylococcus epidermidis"

```

/mol_type="genomic DNA"
/strain="C3937"
/isolation_source="nasal sample"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:1282"
/plasmid="pUR3937"
/country="Spain"
gene 425..1993
      /gene="vga(A)"
CDS 425..1993
     /gene="vga(A)"
     /note="confers resistance to streptogramin A,
           lincosamides
           and pleuromutilins"
     /codon_start=1
     /transl_table=11
     /product="ABC transporter"
     /protein_id="AFH57418"
     /translation="MKILLEGLHIKHYVQDRLLLNINRLKIYQNDRIGLIGKNGSGKT
TLLHILYKKIVPEEGIVKQFSHCELIPQLKLIESTKSGGEVTRNYIRQALDKNPPELLL
ADEPTTNLDNNYIEKLEQDLKNWHGAFIIVSHDRAFLDNLCTTIWEIDEGRITEYKGN
YSNYVEQKELERHREELEYEKYEKEKKRLEKAINIKEQKAQRATKKPKNLSSEGGKIK
GTKPYFASKQKKLRKTVKSLETRLEKLERVEKRNELPPLKMDLVNLESVKNRITIRGE
DVSGTIEGRVLWKAKSFSIRGGDKMAIIGSNGTGKTTFIKKIVHGNGPISLSPSVKIG
YFSQKIDTLELDKSILENVQSSSQNETLIRITILARMHFFRDDVYKPISVLSGGERVK
VALTKVFLSEVNTLVLDEPTNFLDMEAIEAFESLLKEYNGSIIFVSHDRKFIKVVATR
IMTIDNKEIKIFDGTYEQFKQAEKPTRNIKEDKLLLETKITEVLSRSLIEPSEELEQ
EFQNLINERKRLDK"
CDS complement(2397..2594)
     /note="similar to SE_p610 of Staphylococcus epidermidis
           ATCC 12228"
     /codon_start=1
     /transl_table=11
     /product="hypothetical protein"
     /protein_id="AFH57419"
     /translation="MKRQLLQNYILKRKYISNFTKSIRKDILKVTNSRYIIVCENPQR
AGWGFLFTYALVVIDKEHNQQ"
CDS 2651..3262
     /note="similar to SE_p609 of Staphylococcus epidermidis
           ATCC 12228"
     /codon_start=1
     /transl_table=11
     /product="hypothetical protein"
     /protein_id="AFH57420"
     /translation="MSMNSKVAEIRKQKSLTQENLAEKAYVTVRTIQRMEAGEEVSS
ETLKSVSNALDVTVNELFESISSSDKEEEEIMEISKEQQKQFNRYRKNELFTIKLITFSF
IFVFLGLFGIFVGELENGLEQNIYRIIWIWIFLFLSLAIMYYFLNVFISKKLDKKYPMTI
GMKNRNRKNEPVKNGWDFMARYWWIVFPPIGGFLSWLPELTGK"
gene complement(3310..4167)
     /gene="rep"
CDS complement(3310..4167)
     /gene="rep"
     /codon_start=1
     /transl_table=11
     /product="replication protein"
     /protein_id="AFH57421"
     /translation="MSGETVVYKNDMNLVPLRKFNNTEVNLFFTLCKNLKDKGNLTVN
VPFEELKELSNYYSHDKKLFIQDLEKFDYDKVFSLTyreETENVIRKFIKVEIYKD
KEYVAIGVNPdleHIINSLTSNFTKfELKEMthLkStYSKHMFRILKQYKHTGYVKIK

```

IDDFRERLDIPNSYRMTNINQKVLAPIIKELGFI FNNLNINKIKAKKGRKIEWLEFTF
 DAEKRIHNKRQPQMANIDKSRQYISREKTPRWLEERTYEKQIKNEYDPQLEKERKAFL
 KQLQLDWED"

CDS 4709..4909
 /note="similar to SE_p607 of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="hypothetical protein"
 /protein_id="AFH57422"
 /translation="MLNKFSRHKRMCYSSFSISFTTFNIGVISNDKINADSKIRKIFV
 PSKNIKLTTPKQNTIKKQIK"

gene complement(5012..5821)
 /gene="mob"

CDS complement(5012..5821)
 /gene="mob"
 /note="similar to SE_p606 of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="mobilization protein"
 /protein_id="AFH57423"
 /translation="MALKDKYNDNNKNINQTRTSSQNDQLQTVMNQLNEIQASLNQI
 GTNSPKTQMSLSVADKLNQQDLLMKRLEEIEKREYERNQRHDQLLTSIETTASNFNQ
 ATDFTQKRFISAARHYIERINNDNLKQDFHTAIQKELEDVKTDTQNVVKEVQNNQSEL
 RQANNNYKKMIDERMKSNAIVIKQYDQVIHRLTKGITAMFFIVALVMVAFLVISPLGD
 WLGVQHFYEWLNHVLKTHGSAWRYFMLVFPYILFGVLIYAILKAYERL"

gene complement(5520..6530)
 /gene="rlx"

CDS complement(5520..6530)
 /gene="rlx"
 /note="similar to SE_p605 of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="mobilization protein"
 /protein_id="AFH57424"
 /translation="MATTKLSATKSTSRAINYAEKRAVEKSGLNCDVDYAKSSFKAAR
 ELYGKTDGNQGHVVIQSFQPGVETPEQCNQLGLALAEKLVPNHQVAVYTHADTNHVHN
 HIVLNSIDLNTGKKFNNNKQALRDVRAFNDVCRAQGLSVPEKDTARLRYTQTEKAIA
 DPNTTSTAQYSWKDDIREAIDQSTATNMEEFQKHLNQHGITIERVTPKSITYRHLAEN
 KKVRGRKLGEDYNKGGIQHGFERQIQRRQQKHKSDTNFQPKRSTSNRHESTERDTGV
 TQSDWDQFAQDTNELERRQAESARLVDEKARRDREKRVREKPTSRPIINIDRDHGL
 EL"

gene complement(6517..6717)
 /gene="mob1"

CDS complement(6517..6717)
 /gene="mob1"
 /note="similar to SE_p604 of Staphylococcus epidermidis ATCC 12228"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="mobilization protein"
 /protein_id="AFH57425"
 /translation="MEHDPKIKMIVSAILFVMCLMILFYFIFDFDPQFPVILCFSLTFF
 ITGIDLYSISYKKKKKARDTNGNN"

gene complement(6696..7082)
 /gene="mobC"

CDS complement(6696..7082)


```

/gene="mobC"
/note="similar to SE_p603 of Staphylococcus epidermidis
ATCC 12228"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="mobilization protein"
/protein_id="AFH57426"
/translation="MSEQNKFVASDETVGRNRKPNRKAPKQISFRVSESEYLKLLQOSA
ETLNMSVPAFVKKKAQGARLVSPKLDQATRQSVAKDLSMLGANANQIAKYCNQHQHEA
PNYEALERNISELRERLDEIWNMIQK"

```

ORIGIN

```

1  tattcccacc acgcttttcta cgaaagataa cgccttttctt aaattttact ttataagata
61  aagcaaaatt tatcaagtcg ttaagtgggt tggcaagcat tggccttgct agccactaac
121  gtggcagacg cgccagcttg ttggggatta tccccaaagc ccttatgttt tttgcttacg
181  caaaaaagag tggctaattg ctagccattg ttcattaagt aatacaaaata aattgaagaa
241  ataatttggg ttgaacattg acatthtattt gctatthtgtt taagttgaat ttaatacgat
301  aagggaaaagg gtgaaccaac tacatgatta actaatccta ttttcaaaag gaaacaattg
361  aaagtattht atttacaaat agcgtthttag ttgtgtgtgt ttcaattgta cthtttcagga
421  taggatgaaa atactgttag agggacttca tataaaacat tatgthtcaag atcgtthtatt
481  gthtgaacata aatcgcctaa agatthtca gaatgatcgt atthgtthtaa thtggtaaaaa
541  tggaaagtgga aaaacaacgt tactthcacat attatataaa aaaatthtgc ctgaagaagg
601  tattgtaaaa caatthtthc acatthtgaact tattcctcaa thtgaagctca tagaatcaac
661  taaaagtgtt ggtgaagtaa cacgaaacta tattcggcaa gcgcttgata aaaatccaga
721  actgctatta gcagatgaac caacaactaa cthtagataat aactatathag aaaaatthaga
781  acaggatthta aaaaatthtgc atggagcatt thtatathgtt thcacatgatc gcgctthttht
841  agataactta thgtactacta thtgggaaat thgacgagggg agaataactg aatataaggg
901  gaattathgtt aactathgtt aacaaaaaga athtagaaaga catcgagaag aattthagaata
961  thgaaaaatath gaaaaagaaa agaaacgatt ggaaaaagct athaatataa aagaacagaa
1021 agctcaacga gcaactaaaa aaccgaaaaa cthtaagthtca thtgaaggca aataaaaaagg
1081 aacaaagcca tactthtthcaa gthaaagcaaaa gaagthttaga aaaactthtaa aatctcthaga
1141 aaccagacta gaaaaactthg aaagggtcga aaagagaaac gaactthtctc cactthaaat
1201 ggatthttagt aactthtagaaa gthgtaaaaaa thagaactata athacgtggthg aagatthtctc
1261 gggthacaatt gaaggacggg thtthgtggaa agcaaaaaagth tthtagthtthc gcggagggaga
1321 caagatggca athtathcggat cthaatggthac agggaaagaca acgththtatta aaaaaatthgt
1381 gcatggaaat cthtggthttht cattathcgc atctthtcaaa athcggthtatt thtagcaaaa
1441 aatagathaca thtagaathtag athaagagcat thtagaaaaat gthtcaatctt cthtcahaca
1501 aatgaaact cthtathtcaa ctathtctagc thagaatgcat thththtagag atgaththtta
1561 thaaaccaata agthgtctthaa gthggtggaga gcgagththaa gthagcacthaa cthaaagthatt
1621 cthtaagthgaa gthtaathcgt thgtacthaga thgaaccaaca aactthtctthg athatggaaagc
1681 thatagaggcg thtthgaatctt thgtthaaagga athataatggc agthataatth thgtathtctca
1741 cgathcghthaa thtathcghaa aagthagccac thcghaataatg acaththgata athaaagaaat
1801 aaaaataththt gatggcathat atghaacaath thaaacaagct gaaaagccaa caaggaathat
1861 thaaagaagath aaaaaacttht tactthtgagac aaaaathtaca gaagthactca gthcghatthgag
1921 thattghaacct thcghaagaath thagaacaaga gthtcaaaaac thtaataaathg aaaaaagaaa
1981 thtggathaaa thaaathacct thaaaththaaag caataaagath thattctthgtt gthctththtath
2041 thgaathcathg atgggthaaata thtaththaaag thagthgaththg cathaacctath acaththctac
2101 thacctathaat thtghaaththt gthtaactcath caaagaggct thaaacgctgth gaaathcaacg
2161 ththaaagcctt thctththtathg thtathcgtthta thcatctthtth athacathcgtt gthtctcacgth
2221 gthththcathc ththththcathh agthgaacttht thgtathctthta thcacaathth cactgthgathaa
2281 cacaccgththt thaaaththtag ththththgtthta tactggaaaa gcactthtccgth gcacaaagga
2341 ggtgthcathat acathgathaa thctthgctathth thgtacthagath aagctcathth thccaaththt
2401 thgtthgththt gthtctththtathc thattcahaca agagcathaaag thaaaaagaaa cccccagccg
2461 gcacgctggg ggtthththcaca thacaathgath thathctgctath thgtthacttht cagthathatcc
2521 thtctththtathc ththththgthaa athtagathata tactthtcttht thagaathata athththgaaagth
2581 aactgthcgttht thcaththtgcgc ccatctgthcgc gcaathththt gthgtthcathth thththtagthgath
2641 ggagthagththt athgagthathgath acaaththcaaa agththgcagaa athtagaaaaac aaaaathcgtth
2701 aactcaagaa aaththtagcag aaaaaggctth thgthaacagth athgaacaathc aagaathgga
2761 ggctggagaa gaagththgath gthgaaacact thaaagthgthc thcaaacgath thagathgthgac
2821 agthcaathgaa ctaththcgaath ctathctcgtc thctgathaaag gaggagghaaa thaatghaaath

```

2881 atctaaagaa caacaaaagc agtttaatta tcgtaaaaat gaacttttta ctattaaatt
2941 aataacattt agttttattt ttgtgttttt aggactattt ggaatccttg taggtgagtt
3001 aaacggttta gaacaaaata tttaccgcat catttgattt ttcgctttat ttttgagctt
3061 agcaataatg tattatTTTT taaatgTTTT tatttcaaaa aaattagata aaaaatatcc
3121 tatgactatt ggaatgaaaa atagaaatag aaaaaatgaa cctgtaaaaa atggctggga
3181 ttttatggct agatattggt ggattgTTTT tcctattgga gggtttctaa gttggctaatt
3241 tcctgaatta acaggaaaat aaaatacaaaa acaaaaagatc ttttagcaagg gggctaaaaga
3301 tcttttgttt taatcttccc agtctaattg aagttgTTTT aaaaatgctt ttcgctcttt
3361 ttctaattgt ggatcatatt cattttttat ttgtttttca taagtacggt cttctaacca
3421 tctcggcggt ttttcccgcac ttatatattg tcgtgactta tctatattcg ccatttgtgg
3481 ctgtcgttta ttgtgaatgc gtttctcagc gtcaaaaagta aactctaacc attcaatttt
3541 acgtcctttt tttgccttta ttttatgatg attaagggtta ttaaaaaataa agcctaattc
3601 tttaatgata ggggctaata ctttttgatt aatatttgtc atacggtaac tattaggaat
3661 atccagccgt tctctaaaat catcaatttt aatttttaca tagccagtat gtttatactg
3721 cttaagtatt ctgaacatat gcttagaata tgtagattta aggtgtgtca tttctttaag
3781 ttcaaattta gtgaagttac tagttaatga attaataata tgttctaaat ctggattaac
3841 accaatagcc acatactctt tatctttata aatttctact ttagtaaaaa gaataaattt
3901 tctaataaca ttctcagttt cttctctata tgttaaagag aaaactttgt catagaattt
3961 ttctaaattt tgaataaaaa gctttttatc atgactatag taattacta attcttttaa
4021 ttcttcaaat ggcacattaa cagtcaaat gcctttatct ttttaattat tacacaaagt
4081 aaaaaataga ttaacttcag tattatataa ttttctcagt ggaactaaat tcatatcatt
4141 tttatatact actgtttctc cactcaacta actccactcc aatctaaaag aaacctatat
4201 agaataaaga ttctatttaa ctttaattgt aaatacttat aatcactatg ttataaacia
4261 taataacata aagaaaccta atataaaaa agtttcttta gtttaatgat tggttgcctt
4321 tagtttaatg attggttgc ctttagttta tgattggttg cctttagttt aatgattggt
4381 tgcctttaac atttcaaact tattgtcact ctaaggatca aatgactcct aaaaaggttt
4441 taaaagatt tataaaaaaga tattaaaaag ttcggggcaa tttgcccctc acaaatcaa
4501 aagacaaaaa ggaaaccac cacaaatgtg gtgggttttt attatttaa aaagtaataa
4561 gtgatataac tttaatgcat tattccaatt gctttattga cattgagcct ctgaaccctt
4621 aataaacctt aaaactgtcg actcgtcgggt ttcatagctc acactatccc gacattcgtc
4681 gaaacagttt aattaagggt tcttctcaat gctcaataaa ttttctcggc ataagcgcat
4741 gtgctattct tcattttcca tatcttttac aacctttaat atcgggtgga ttagtaatga
4801 taaaataaat gctgattcta aaatcagaaa aatatttgtt ccttcaaaaa atattaagtt
4861 gaccacatat ccaaaaagac aaaatacaat aaaaaaacia ataaagtga caatagaatt
4921 caagggcagc actccttttt ggtttctacg ctatttttaag cttgatatag cttcttcatt
4981 aaacaaaagg taattttcta tttatttgtt attaaagacg ctcatatgct tttaaaatgg
5041 catatataag cactcfaat aaaatataag gtacaagata gaaaacaagc atgaaataac
5101 gccatgctga atgccccgtt ttaagcacgt ggttcagcca ttcgtaaaaa tggttgacgc
5161 ctaaccagtc acctaagga cttataacta aaaaggcgac catcactaag gcaacgataa
5221 aaaacatggc tgtgatgcct ttagttaaac gatgtatgac ttgatcatat tgtttaatca
5281 ctattgctgt gctcttcata cgttcatcaa tcatTTTTT ataattatta ttggcttgtc
5341 gcagttcgga ttggttgtt tgaacttct taactacgtt ttgtgtgtct gttttgacat
5401 cttctaattc tttttgtata gctgtgtgaa aatcttgtt taaattatcg ttattaatcc
5461 gttcaatata atgtcttgcc gcgcttataa aacgcttttg tgtgaagtct gttgcttgat
5521 taaagtccga ggccgtggtc tcgatcgatg ttaataattg gtcgtgacgt tggtttctct
5581 cgtactctct tttctcgatc tcttcgagcc ttttcatcaa caagtcttgc tgattctgca
5641 gcttgteggc gacgctcaag ctcatttgtg tcttgggcga attggtccca atctgattga
5701 gtgacgctgt tatctcgttc agttgattca tgacggtttg aagttgatcg ttttggctgg
5761 aagttcgtgt ctgatttatg tttttgttgt tgcgtcgtt gtatttgtct ttcaaagcca
5821 tggttgatgc ctcttttatt gtaatcttcg cccaatttac gcccgctac ttttttattt
5881 tcagctaaat gccgataggt aatgcttttg ggggtaacac gttcaatcgt aataccatgt
5941 tgattcagat gtttttgaaa ttcttcata tttgctcgtg ttgattggtc aattgctca
6001 cgtatgtcat ctttccatga gtattgtgct gtcgacgtcg tgttagggtc ggcaatcgt
6061 ttttctgttt gggataaacg taagcgtgct gtgtcttct caggcacgct caaccctgt
6121 gtcgacaaa cctcgtcgtt gaacgctctc acatcgcgta gggcttgttt attattgta
6181 aatttcttac ctgtattgag gtcaattgaa ttaagtacia tatgattgtg tacatggttt
6241 gtatctgcat gcgtatagac ggcgacttga tgattgggga cgagttttc agcaagcgt
6301 aatcctaatt ggttacattg ttcgggcgtc acttcgccag gttgaaacga ttggataatg
6361 acatgccctt gattaccgtc tgttttgcca tacaattcac gagcggcttt aaaactagat

6421 ttggcatagt ccacgtcaca atttaagcca cttttctcaa cggcacgttt ttcagcgtaa
 6481 ttgatggccc gtgatgttga tttagtcgca ctttaatttag ttggtgccaat tggatcacg
 6541 cgcttttttc tttttatatg atatataata atcaatacct gtgataaaag ttaaaagtga
 6601 aaaacacaaa atcaccgga attgtggatc aaagaaaata aaataaaaaca atatcattaa
 6661 acacatcaca aataaaatgg cacttacaat cattttttatt tttggatcat gttccatc
 6721 tcatctaacc tttcacgtaa ttcactaatg ttacgttcta atgcttcgta gttcgggtgct
 6781 tcgtggtgat gttgggtgca atatttcgca atctgattgg catttgcacc taacatactc
 6841 aaatcttttg ctaccgattg tcgtggtgct tgatccaatt tgggtgatac caatcgggcg
 6901 ccttgtgcct ttttcttaac gaaagcaggc acactcatat ttaaagtttc agctgattgt
 6961 tgtaacttta aatattcgga ttcgctcaca cgaaaactga tttgtttcgg cgccttacgg
 7021 ttgggtttac ggtttcgccc aacagtttcg tcgctagcca caaatttatt ttgttcgctc
 7081 at

GenBank JQ319423.1

LOCUS JQ319423 5934 bp DNA linear BCT 27-MAR-2012
 DEFINITION *Staphylococcus aureus* strain C3898 transposon Tn5406, complete sequence.
 ACCESSION JQ319423
 VERSION JQ319423
 KEYWORDS .
 SOURCE *Staphylococcus aureus*
 ORGANISM *Staphylococcus aureus*
 Bacteria; Firmicutes; Bacillales; *Staphylococcus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5934)
 AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E., Aldea,M.J., Royo,G., Revillo,M.J., Zarazaga,M. and Torres,C.
 TITLE Genetic environment and localization of *lnu(A)*, *lnu(B)* and *vga(A)* genes of MRSA and other staphylococci from animal and human origin
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 5934)
 AUTHORS Lozano,C., Aspiroz,C., Rezusta,A., Ruiz-Garcia,M., Gomez-Sanz,E., Aldea,M.J., Royo,G., Revillo,M.J., Zarazaga,M. and Torres,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-DEC-2011) Area de Bioquimica y Biologia Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios, 51, Logrono, La Rioja 26006, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..5934
 /organism="*Staphylococcus aureus*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="C3898"
 /isolation_source="skin lesion sample"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:1280"
 /country="Spain"
 mobile_element 96..5562
 /mobile_element_type="transposon:Tn5406"
 gene 229..1314
 /gene="tnpA"
 CDS 229..1314
 /gene="tnpA"
 /note="transposase"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="TnpA-like protein"
 /protein_id="AFG16935"
 /translation="MKVQKIVVDNKAYPLFILLDEQFEVVEPVMSFIKYLDTNKSPN

```

TIKTYCYHLKLFYVFMQQRKISLDEIQFDELANFVWGLRNPTENANVIDIHPKEAKRE
ESTVNAILNAVLSYLEYLSRSGGFKMLDLFNETRGRNYKGFHLHVSKGKPYKRNVLKL
REKKKMIRTLNHSEVKEIVEACHTLRDKLIIMLYEGGMRIGEVLSRLADIVTWDNQ
VHITPREESLNGAYIKLRKERVIHVSKELMALYTDYLVHEYYDELEHDIYVFIALKESH
FGQPLKYQSVLDLVRRLNKRRTGIVFTPHTLRHTHATELIRNGWDAAYVQKRLGHAQVO
TTLNTYVHLSNQDMKEEFKKYLEGRDK "
gene      1311..3209
          /gene="tnpB"
CDS       1311..3209
          /gene="tnpB"
          /note="transposase"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="TnpB-like protein"
          /protein_id="AFG16936"
          /translation="MTMNTKRKIISSVAIGKKAEMNSKLEGYWADDRWDIRKCP LPS
AIELSKSPSLRNRWVNFDRVENLWLRTELKFFYYHMTNEVWNAKTVWIRKGTVIN KM
LGFLDMKYPHIESITEVPIEKAMTEYR TYLVEQGVRIITTTNHKLNKAKQERITVKANSY
YVTNLKQFMFEFYEDYYFDGEEWEKDVWDRRKMNLPSDKVNPTQY EYLVSFKEIPSIYY
RELTKRYCKLKLNTVSFVSHVSDIAGRLKEFFVFLNKNYKHLTRLHQLTREQIEHYLAE
LNKSGIKPSTLMGKISVLDGFFTTIQKFDWNDVPSKILVFQEDY PKVPKATPRY IDEY
VLEQLNSHLDDLPAIYIATMVMI IQEGGMRI SELCTLKRDC LLEDKEGDYFLKYQWKM
KKEHTIPI SREVAGLIKAHEKHVSEEFGGCEYLFPRKDGSP LKQDTRRELNEVAHKK
NIVDRAGSVFRFHAAFRHTVGT RMINNGIPQHIVQKFLGHESEPEM TSYAHIFDETL
KEEFKFKETLVTNQGSI IDIEESE EANKTDLQWFKKNINAQVLPNGYCR LPIIAGPC
PHANACLDCTHFC TSKKFLSQHKDHLAHTKELLAIAKEKQWQRQ IETNSRVQERLEQI
IGSLKETE "
gene      3210..3593
          /gene="tnpC"
CDS       3210..3593
          /gene="tnpC"
          /note="transposase"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="TnpC-like protein"
          /protein_id="AFG16937"
          /translation="MGKQSRNTDKIIQLAKEKSHNTRLNVEKII SKMSLEGKTINFNT
VAAEAKVSKSWLYKESDIRKQIENIRHRQLNGKRLNSTPIKKNKKSEEILIKTLKARI
KELEEEENGQLKNQVQKLYGELYFKD "
gene      3910..5484
          /gene="vga(A)-variant"
CDS       3910..5484
          /gene="vga(A)-variant"
          /note="putative ABC protein"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="Vga-A variant protein"
          /protein_id="AFG16938"
          /translation="MKILLEALRIKHVYQDRLLLNIDQLQIYQNDRIGLVGGNGSGKT
TLLHILDEKLFPEEGTVTQYSRCELIPQLKHMETTKSGGEVTRKYIQQALDKNPELLL
ADEPTTNLDTNYIENLERKLDWHGAFIIVSHDRAFLDTLCTSIWEIKDGGITEYKGN
YSDYIEQKELENRQEQLAHEKYEKEKKQLEEAIKLKEEKAQRATKKPKNISSEARLK
GAKPYFANKQKLRKTAKALETRLDKLEKVEKTELPLKMDLLNSETFKNRIILRVE
DVSGVIEERVLWKAASFYVRGGDKLAIIGSNGTGKTTFIKKIVQDKPGISFSPSVKIG
YFSQNLDILELDKTI LENVQSSSRQNETLIRTI LARMHFFRDDVHKPVNVLSSGGERVK
VALTKVFLSDVNTLVLDEPTNFLDMEAIEAFESLLEEYEGSVIFVSHDRRFIEKIATR
IMMIDNKEIKIFEGTYDQFKAKQAREETRIKEDKKLLETRITEILSRLSIEPSEEL
EKEFQNLIN EKRNLDN "

```

ORIGIN

1 gttcgttggg acatccacgt gaaatTTTTT gtattgcggt gagagaaaat gccaatgcaa
61 tcatcgcagt tcataatcat ccatccggtg atgtattaaa cgtagtatac taatctatag
121 tactttaaagt atTTAAAGAA agtataatgg atgatatact actTTGGGTA cattatatca
181 ataggagaaa tataaagtat ataaagtatt caaagtgggg gaggaaaaat gaaagtgcaa
241 aaaatagtag tggataataa agcttatcca ctatttataat tgcttgatga acaatttgaa
301 gtagttgaac cggttatgag ctTcattaaa tatctagata atactaataa gtcacccaac
361 actataaaaa catattgtta ccacctaag ttattttatg tgTTTTatgca gcaaagaaaa
421 atctcgttag acgaaattca gtttgacgag ttggcgaatt ttgtaggatg gttacgtaac
481 cccacagaaa acgcgaatgt tattgacatt cacccaaaag aagctaaaag agaggaatct
541 actgttaatg ctatttctaa tgccgtgatt agttatctag aatatttgag tcgttctggt
601 ggctTTAAAA tgcttgattt gttcaatgaa acacgaggca gaaactacaa aggatttctc
661 catcatgtga gtaaaggaaa gccatataaa agaaacgtat tgaagttaag ggaaaaaaag
721 aaaatgatta ggacactaaa tcattcagag gtaaaagaaa tcgtagaagc ctgtcacacc
781 ctCAGAGATA aattaatcat aatgcttatg tatgaaggTg ggatgcgaat aggagaggtt
841 ttgtctctaa gactggcaga catagtgact tgggataatc aggttcacat aacacctaga
901 gaagaaagTc tgaatggagc ttacataaag cttagaaaag aaagagtaat ccatgttagc
961 aaagagTtaa tggctctcta tacagactat ctTgtgcatg aatactacga tgaattagag
1021 catgattatg tatttatagc attaaaagaa tcgcattttg ggcagccttt aaaatatcaa
1081 agtgtactcg atctcgttcg gcggttgaat aaaagaacag gtattgtgtt tacacctcat
1141 acgttacgcc ataccctatg gacagaact attagaatg gttgggatgc tcgcttacgtc
1201 caaaaaagat taggacacgc acaggttcag accactttaa acacatacgt ccacctctct
1261 aaccaagata tgaagaaga atTTAAAAg tatcttgaag ggagagataa atgacgatga
1321 ataccaaaag aaaaattata agctctgtag caattggtaa aaaaatagca gaaatgaaca
1381 gcaattaga aggatattgg gctgatgata gatgggatat cagaaagtgc ccactacctt
1441 cagcaatcga actttctaaa agcccatctt taagaaaccg atgggtaaat tttgaccgag
1501 ttgaaaattt gtggttaaga accgaattga aattcttttt ctattaccac atgaccaatg
1561 aggtttggaa tgctaaaacc gtgtggatta gaaaaggaaac tgtaattaat aaaatgttgg
1621 gtttcttaga tatgaaatat cctcacatag agtcaatcac agaagtacca attgaaaaag
1681 ctatgactga atacaggact tacttagtag agcaaggagt cagaataaca actaccaatc
1741 acaagctaaa tgccaaacaa gaaagaatca cagtaaaggc aaattcatac tatgtgacaa
1801 atcttaagca gtttatggag ttttatgaag attattattt tgacggagaa gaatgggaaa
1861 aggatgTttg ggatagaaga aaaatgaatc tccttctga taaagtcaat cccactcaat
1921 atgagtatct cgtatctttc aaagagattc ctagtattta ttacagagag ctgacaaaac
1981 gatattgcaa gctcaaatta aacaccgtga gcttttctca tgtaagcgat atcgcaggca
2041 ggttgaaaga gttttttgta tttcttaata aaaattataa acatttaaca agacttcatc
2101 agcttaccCG agagcaaatt gaacactact tggcagaact gaataaatca ggaattaaac
2161 cgagcacttt aatggggaaa atatcggttt tggacggttt ctttactaca attcagaagt
2221 ttgattggaa tgacgttctc tcaaagatac tagttttcca agaagattat cctaaggtac
2281 cgaagcaac accgagatat attgatgaat acgttttgga gcaattaaac agtcatttag
2341 atgatttacc tgcttatata gcaactatgg taatgatcat tcaagaaggt ggtatgagaa
2401 tcagtgagtt gtgtactttg aaaagagatt gccttctcga agataaggaa ggtgattact
2461 ttttaaaata ttaccaatgg aaaatgaaaa aagaacatac tattccgata tcgagagaggy
2521 tagctggtct tattaaggca catgaaaagc atgtgtcaga ggagtttggT ggtatgtaat
2581 acctctttcc tcgtaaagat ggctctccat tgaaacagga tactttttaga cgggaactaa
2641 acgaggTggc acataagaaa aatatcgtgg atcagagcag aagcgttttt agattccacg
2701 cacacgcatt tcggcatacc gttggtacaa gaatgattaa taatggcatt cctcaacata
2761 ttgtccagaa atTTTTtagga catgaaagcc cggaaatgac gagcagatat gccacattt
2821 tcgatgaaac attaaaggaa gagttctcta aattcaaaga gacgcttgTg acaaatcagg
2881 gcagcattat tgacatagaa gaatccgaag aagccaataa aactgatctt caatggttca
2941 agaagaacat taacgctcag gtattgcccA atggctattg tcgactcccg ataatcgtctg
3001 gtcttTgtcc tcacgccaat gcttgTttag actgcacaca cttctgtaca agcaaaaagt
3061 tcttatcgca acataaagat cacttagctc atactaagga attattagct atcgcaaaag
3121 agaaacaatg gcaacgacag attgaaacca attctcgtgt acaagagcga ctagagcaga
3181 taataggcag cttaaaggag acggagtaaa tggggaaaca atcaaggaat actgataaga
3241 ttattcaact ggcaaaagaa aaaagtCaca atactagact aaatgtagaa aagataattt
3301 caaaaatgTc attagaaggc aaaactataa atTTtaatac agtagctgca gaagcaaaag
3361 tctcgaaatc ttggttgat aaagaaagTg atataagaaa acaaattgaa aatatccgac
3421 atcgccaact caatggaaaa agattgaact ctacgcctat aaagaaaaat aaaaaatcag
3481 aagaaatact tatcaaaacg ctaaaagcga ggataaaaaga attagaggaa gaaaatggtc

3541 aattgaaaa tcaagttcag aaattatatg gtgagcttta ttttaaagac tagaaagaat
3601 actctgactt aaacatttga catttccccg tcatttgttt aaggtaaatt taattagacg
3661 aaggaaaggg tgaaccaact acatgattaa ctaatcctat ttttgaaagt aaacaatcga
3721 aggtgtttga tttacaaatg atgtttttatt tgtgctgcct tcaattgtga tcttcaggat
3781 aggattaaat ttctgtagtt ggctctaaaa gagtcttttt tagagtacat ctatattgat
3841 ttatgcctcc tattctgaat gaattaggag gcatttattg tctccgatta tttttaaggg
3901 gatgataata tgaaaatatt gttagaggct ctctcgataa aacactatgt tcaagatcgt
3961 ttactgttga acatagatca attacagatt tatcagaatg accgaattgg gttagttggg
4021 ggaaatggca gtggaaaaac aacgttactt cacatattgg atgaaaagct ttttctgaa
4081 gaaggtactg taactcagta ttcacgggtc gaactcattc cacaattgaa acatatggaa
4141 acaacaaaa gtggtggtga agtaacacga aaatatattc agcaagcact tgataaaaaac
4201 ccagaactgt tacttagcaga tgaaccgaca actaaccttg atacaaatta tatagaaaac
4261 ttagagcgaa aattaaagga ctggcatgga gcatttatca tcgtttcaca tgatcgtgct
4321 ttcttagata ctctttgtac gagtatatgg gaaatcaaag acgggggtat aaccgaatac
4381 aaagggaaact atagtgacta tattgagcag aaagaattag aaaatcgcca agagcaatta
4441 gcacatgaaa aatatgaaaa agaaaagaaa cagttagaag aggccataaa gttaaaagaa
4501 gagaaagctc aacgagctac taagaaaccg aaaaataaa gttcatcgga agcaaggcta
4561 aaaggagcga agccatactt cgcaaataaa cagaagaagt tacggaaaac ggcaaaagct
4621 ctagaacta gactggataa gcttgaaaag gttagaaaaa caaaagaact cccccactt
4681 aaaatggatt tattgaattc agagactttt aaaaatcgga ttatactccg tttgaagat
4741 gtttcgggtg taattgagga acgagtattg tggaaagcag ctagttttta cgttcgagga
4801 ggagataaagc tggcaattat cggctctaac ggtacgggca agaccactt tattaaaaa
4861 attgttcag ataagccag ttttctattc tcaccatctg ttaaaattgg ttactttagc
4921 cagaatctag acatattaga gctcgacaag actattttag aaaacgtcca atcttctca
4981 cggcaaaatg aaactcttat tcgaaccatt ctagcgagaa tgcatttttt cagagatgat
5041 gttcataaac cagtaaatgt cttaagtggg ggagagcgag ttaaggtagc actaactaaa
5101 gtgttcttaa gtgatgttaa tacgttagta ttagatgaac caacaaactt tcttgatag
5161 gaggtatag aggcgtttga atccttatta gaggagtatg aaggaaagcgt aattttgtc
5221 tcccatgatc gtaggtttat cgaaaaaata gctaccgaa tcatgatgat tgataataaa
5281 gaaattaaaa tatttgaagg aacatattgac caattttaaag ctaaacaagc tagggaggaa
5341 acacgggata taaaagagga taaaaactt ttacttgaaa caaggattac tgagatactc
5401 agtcgattga gtattgaacc ttcggaggaa ttagaaaaag agttccaaaa cctaattaac
5461 gagaaaagaa atttagataa ttgaatcact ttaaggacat gtctttaaag tgtaaaggtt
5521 attacaatcg gcttttttat ggattactct tgatatgatg taacgcctc acaagaagat
5581 atcataacaa caatgaggtt gaaggagtgt ggtttgattt tagggataga tttattggat
5641 catattataa tcggtgataa tagatttacc agtctttag aagcgggtta ctttgatgaa
5701 aatgattgaa gttgatagaa ttaatgacgt atcttgtgta taatacctac gaagtacttt
5761 cattggagga aaaatagtga ctctatttat tattatcggg gttctcgtgc caatggttta
5821 taccatgcag ttaaatatta aaaatgaacc tgtaacaaag cgcaatcttt taataacatt
5881 agctttatct acgttaggta ttttagtaac cgcgtagca ggtgtaatcg ttac

**ANEXO 4: TIPOS DE *spa* Y
SECUENCIAS TIPO
REGISTRADAS**

NUEVOS TIPOS DE *spa*

Tipo de <i>spa</i> (cepa)	Repeticiones
t6092 (C2556)	04-44-33-33-34
t6287 (C2610)	15-21-12-16-02-16-02-16-02-25-17-24
t6288 (C2684)	14-44-12-13-12-17-23-18-17
t6289 (C2561)	07-23-21-24-24-33-17
t6647 (C2630)	07-23-12-21-17-34-34-34-33-34-34-34
t7577 (C2942)	08-16-16-46-24-25
t8100 (C3672)	08-16-25
t8409 (C4151)	08-16-52-25-34-24-25

NUEVAS SECUENCIAS TIPO

ST (cepa)	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>
ST1731 (C2552)	2	2	2	2	186	3	2
ST1732 (C2676)	13	20	1	2	187	91	37

