



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

| |
|--|
| Título |
| Epidemiología molecular de <i>Staphylococcus spp.</i> desde un enfoque <i>One Health</i> : genes emergentes e inusuales de resistencia a antibióticos y de virulencia |
| Autor/es |
| Laura Ruiz Ripa |
| Director/es |
| Carmen Torres Manrique |
| Facultad |
| Facultad de Ciencia y Tecnología |
| Titulación |
| |
| Departamento |
| Agricultura y Alimentación |
| Curso Académico |
| |



Epidemiología molecular de *Staphylococcus spp.* desde un enfoque **One Health** : genes emergentes e inusuales de resistencia a antibióticos y de virulencia, tesis doctoral de Laura Ruiz Ripa, dirigida por Carmen Torres Manrique (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2021
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Epidemiología molecular de
Staphylococcus spp. desde
un enfoque *One Health*:
genes emergentes e inusuales
de resistencia a antibióticos
y de virulencia.

*Molecular epidemiology of
Staphylococcus spp. through
a One Health approach:
emergent and unusual
antibiotic resistance and
virulence genes.*

Tesis Doctoral con
Mención Internacional

Laura Ruiz Ripa

Logroño, 2020



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Departamento de Agricultura y Alimentación
Área de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Epidemiología molecular de *Staphylococcus* spp. desde un enfoque *One Health*: genes emergentes e inusuales de resistencia a antibióticos y de virulencia

Molecular epidemiology of *Staphylococcus* spp. through a One Health approach: emergent and unusual antibiotic resistance and virulence genes

Memoria presentada por **LAURA RUIZ RIPA** para optar al título de Doctora con la Mención Internacional por la Universidad de La Rioja

Logroño, octubre de 2020



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

Por la presente declara que,

La memoria titulada “**Epidemiología molecular de *Staphylococcus* spp. desde un enfoque *One Health*: genes emergentes e inusuales de resistencia a antibióticos y de virulencia**”, que presenta Dña. **LAURA RUIZ RIPA**, Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad del País Vasco, ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja, bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Lo que hace constar en Logroño, a 6 de octubre de 2020.

Fdo.: Carmen Torres Manrique

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, Carmen, por todo lo que he aprendido estos años y por contagiarme su ilusión por la investigación. Por su confianza, por su apoyo continuo y por animarme durante mi estancia en Berlín cuando estaba al borde del colapso.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Agricultura y Alimentación, especialmente a Myriam y Fernanda, por su apoyo y ayuda siempre que la he necesitado. A Susana y Carmen, por su infinita alegría y por haberme dejado trabajar esas cepas de aire que tanto han dado de sí.

A los responsables del Servicio de Microbiología de los hospitales con los que he colaborado, muy especialmente a José Manuel Azcona y Carmen Aspiroz, gracias por confiar en mí para estudiar algunas de las cepas de esta tesis. Gracias a Carmen Simón y Carmelo ortega por las cepas aportadas. A todos los miembros del grupo SaBio del IREC, especialmente a Ursula Höffle, por el conocimiento veterinario que han aportado y por estar siempre dispuestos a resolver todas mis dudas.

Thanks Prof. Dr. Stefan Schwarz for hosting me in your research group at the Freie Universität Berlin, it was really a great pleasure to work with you. My special thanks to Andrea for everything I learned with her and for making my stay in Berlin so much more enjoyable. Thanks to Dennis and Inga for taking the time to teach me all I know about WGS.

Gracias a todos los compañeros de Portugal, Túnez y Argelia que han pasado por el laboratorio en estos años. Porque hemos sabido aprender unos de otros y espero haberos hecho vuestra estancia en Logroño un poquito más agradable. A todos los chicos de TFG y TFM que he tenido la oportunidad de conocer y que han aportado un aire fresco al laboratorio A Miri, Carmencita, Vane, Dani, Dante, Filipe, Quique y todos los antiguos compañeros del Lab229 con los que he compartido momentos fuera del laboratorio. Gracias por adoptarme en esa gran familia chicos. Gracias a Elena por su generosidad y su ayuda siempre que la he necesitado. A Sara y Sandra, por animarme y ayudarme en estos últimos meses. Os deseo lo mejor en este camino que estáis empezado. Tranquilas, que todavía os quedan unos mesecitos por aguantarme.

Sara, gracias por absolutamente todo. Contigo la palabra amistad se queda corta. A Andrea, por ser una persona tan bonita y tener la capacidad de alegrarle el día a cualquiera. A Paula, porque desde el primer momento conectamos de una forma especial y porque tus abrazos me llenan de vida. Rosa, no me puedo imaginar como hubiera sido este último año de tesis sin ti, porque me has enseñado que una sonrisa tiene poder curativo. Eres de esas personas que quiero tener siempre junto a mí, y se que así será.

A mis amigas de siempre, gracias por hacerme ver que hay vida fuera del laboratorio, por escucharme cuando lo necesitaba y por acordaros de mí incluso cuando yo no me acordaba de nadie. Especialmente a ti Yoana, que eres una parte vital para mí. Siempre dices que estás orgullosa de mí, pero yo de ti también pequeña.

A mis padres, porque nunca podré agradecer lo suficiente todo lo que hacéis por mí día a día, porque todo lo que soy y seré es, sin duda, gracias a vosotros. Gracias a toda mi familia por su cariño y apoyo incondicional en cada paso que doy. A mis peludas T y G, porque no hace falta hablar para entenderse.

Gabriel, nuestra historia empezó a la vez que esta tesis y sin ti no lo hubiera conseguido. Gracias por "hacerlo fácil", especialmente en estos últimos meses que no me aguantaba ni yo. Porque juntos formarnos el mejor equipo. Y el resto ya lo sabes pequeño.

FINANCIACIÓN

Esta tesis se ha realizado en el seno del proyecto de investigación SAF2016-76571-R, financiado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y cuya investigadora principal es la profesora Carmen Torres Manrique.

Durante el desarrollo de esta tesis la doctoranda ha disfrutado de un contrato predoctoral FPI de la Universidad de La Rioja, financiado por la Comunidad Autónoma de La Rioja.

Índice

| | |
|--|------|
| ABREVIATURAS | i |
| LISTA DE TABLAS | iv |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| RESÚMEN/ABSTRACT | x |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. La problemática de la resistencia a los antibióticos y el enfoque <i>One Health</i> | 3 |
| 2. El género <i>Staphylococcus</i> . Características generales | 5 |
| 2.1. <i>Staphylococcus</i> coagulasa-positivo (SCoP) | 6 |
| 2.1.1. <i>S. aureus</i> | 6 |
| 2.1.2. Grupo <i>S. intermedius</i> | 7 |
| 2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativo (SCoN) | 9 |
| 3. Factores de virulencia y capacidad de evasión del sistema inmune humano en <i>Staphylococcus</i> | 11 |
| 4. Dianas y mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>Staphylococcus</i> | 15 |
| 4.1. Antibióticos β -lactámicos | 16 |
| 4.2. Antibióticos no β -lactámicos | 17 |
| 4.3. Oxazolidinonas | 20 |
| 5. Elementos de adquisición y diseminación de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia | 23 |
| 6. Técnicas de tipado de <i>Staphylococcus</i> | 26 |
| 6.1. Tipado de la región polimórfica del gen <i>spa</i> | 27 |
| 6.2. Tipado mediante MLST (<i>Multilocus Sequence Typing</i>) | 27 |
| 6.3. Tipado del locus <i>agr</i> | 27 |
| 6.4. Electroforesis en campos pulsados (PFGE) | 28 |
| 6.5. Tipado del SCC <i>mec</i> | 28 |
| 7. Epidemiología y líneas genéticas de <i>S. aureus</i> | 31 |
| 7.1. <i>S. aureus</i> en humanos | 31 |
| 7.1.1. SARM asociado al ámbito hospitalario (SARM-AH) | 31 |
| 7.1.2. SARM asociado a la comunidad (SARM-AC) | 33 |
| 7.2. <i>S. aureus</i> en animales y en el medio natural | 34 |
| 7.2.1. SARM asociado a ganado (SARM-AG) | 34 |
| 7.2.2. <i>S. aureus</i> en animales de compañía | 37 |
| 7.2.3. <i>S. aureus</i> en el medio natural | 38 |
| 8. El género <i>Enterococcus</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| OBJETIVOS/OBJECTIVES | 41 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 47 |
| 1. Cepas estudiadas | 49 |
| 1.1. <i>Staphylococcus</i> spp. de muestras traqueales de aves silvestres | 49 |
| 1.2. <i>Staphylococcus</i> spp. de muestras ambientales de granjas porcinas | 50 |
| 1.3. <i>S. aureus</i> de animales de producción con signos de infección | 50 |
| 1.4. SCOP de animales de compañía con signos de infección | 51 |
| 1.5. <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a linezolid de origen clínico | 51 |
| 2. Determinación de la sensibilidad a antibióticos | 52 |
| 2.1. Método de difusión en disco | 52 |
| 2.2. Método de microdilución | 54 |
| 3. Extracción de ADN | 55 |
| 3.1. Extracción de ADN genómico | 55 |
| 3.2. Extracción de ADN plasmídico | 56 |
| 3.3. Cuantificación del ADN | 56 |
| 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 57 |
| 5. Electroforesis en gel de agarosa | 57 |
| 6. Identificación de las cepas | 58 |
| 6.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF | 58 |
| 6.2. Identificación basada en el gen <i>nuc</i> | 58 |
| 7. Tipado molecular | 59 |
| 7.1. <i>spa</i> -tipo | 59 |
| 7.2. MLST | 59 |
| 7.3. PCR específica <i>S. aureus</i> del CC398 | 62 |
| 7.4. Tipado del locus <i>agr</i> | 63 |
| 7.5. PFGE | 64 |
| 7.6. Tipado del <i>SCCmec</i> | 65 |
| 8. Determinación de los mecanismos de resistencia a antibióticos | 67 |
| 9. Estudio de los factores de virulencia | 77 |
| 10. Estudio del contenido en bacteriófagos | 80 |
| 11. Caracterización de entornos genéticos | 81 |
| 12. Transferencia génica | 84 |
| 12.1. Conjugación | 84 |
| 12.2. Transformación mediante electroporación | 85 |
| 12.3. Identificación de los transconjugantes y transformantes | 85 |
| 13. Secuenciación | 85 |
| 14. Secuenciación completa del genoma (WGS) | 86 |
| 14.1. Extracción de ADN genómico | 86 |

| | |
|---|------------|
| 14.2. Secuenciación | 87 |
| 14.3. Análisis de las secuencias | 87 |
| 14.4. Relación filogenética | 87 |
| 15. Análisis estadísticos | 88 |
| RESULTADOS | 89 |
| 1. Prevalencia, diversidad de especies, resistencia a antibióticos y líneas genéticas de <i>Staphylococcus</i> spp. de diversos orígenes | 91 |
| 1.1. <i>Staphylococcus</i> spp. de muestras traqueales de aves silvestres | 91 |
| 1.2. <i>Staphylococcus</i> spp. de muestras ambientales de granjas porcinas | 96 |
| 1.3. <i>S. aureus</i> de animales de producción con signos de infección | 100 |
| 1.4. SCoP de animales de compañía con signos de infección | 103 |
| 2. Mecanismos de resistencia a linezolid en <i>Staphylococcus</i> spp. de diferentes orígenes. Estudios comparativos con <i>Enterococcus</i> spp | 108 |
| 2.1. <i>Staphylococcus</i> spp. LZD ^R de muestras de aire de granjas porcinas y de procesos infecciosos de animales de producción | 108 |
| 2.2. <i>Staphylococcus</i> spp. LZD ^R de origen clínico | 111 |
| 2.3. <i>Enterococcus</i> spp. LZD ^R de muestras de aire de granjas porcinas | 117 |
| 2.4. <i>Enterococcus</i> spp. LZD ^R de origen clínico | 119 |
| 3. Factores de virulencia en <i>Staphylococcus</i> spp. diferentes orígenes | 127 |
| DISCUSIÓN | 133 |
| 1. Prevalencia, diversidad de especies, resistencia a antibióticos y líneas genéticas en <i>Staphylococcus</i> spp. de diversos orígenes | 135 |
| 1.1. <i>Staphylococcus</i> spp. de muestras traqueales de aves silvestres | 135 |
| 1.2. <i>Staphylococcus</i> spp. de muestras ambientales de granjas porcina | 139 |
| 1.3. <i>S. aureus</i> de animales de producción con signos de infección | 141 |
| 1.4. SCoP de animales de compañía con signos de infección | 143 |
| 2. Mecanismos de resistencia a linezolid en <i>Staphylococcus</i> spp. de diferentes orígenes. Estudios comparativos con <i>Enterococcus</i> spp | 145 |
| 2.1. <i>Staphylococcus</i> spp. LZD ^R de muestras de aire de granjas porcinas y de procesos infecciosos de animales de producción | 145 |
| 2.2. <i>Staphylococcus</i> spp. LZD ^R de origen clínico | 146 |
| 2.3. <i>Enterococcus</i> spp. LZD ^R de muestras de aire de granjas porcinas | 149 |
| 2.4. <i>Enterococcus</i> spp. LZD ^R de origen clínico | 150 |
| 3. Factores de virulencia en <i>Staphylococcus</i> spp. diferentes orígenes | 153 |
| CONCLUSIONES/CONCLUSIONS | 157 |
| REFERENCIAS | 165 |
| ANEXOS | 203 |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> (casete de unión a ATP) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| agr | <i>Accessory gene regulator</i> (gen regulador accesorio) |
| Aminoácidos: | A, alanina; D, aspártico; E, glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; Y, tirosina |
| Antibióticos: | AMK, amikacina; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacino; CLI, clindamicina; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FFN, florfenicol; FOS, fosfomicina; FOX, cefoxitina; FUS, ácido fusídico; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; LEV, levofloxacino; LZD, linezolid; MUP, mupirocina; OXA, oxacilina; PEN, penicilina; QDA, quinupristin-dalfopristin; STR, estreptomicina; SXT, trimetoprim,sulfametoxazol; TDZ, tedizolid; TEI, teicoplanina; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; VAN, vancomicina; I, resistencia intermedia; In, resistencia inducible. |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ARNr | ARN ribosómico |
| ARNt | ARN de transferencia |
| CA-SFM | <i>Comité del Antibiogramme Société Française de Microbiologie</i> |
| CAT | <i>Chloramphenicol acetyltransferase</i> (cloranfenicol acetiltransferasa) |
| CC | Complejo Clonal |
| CDS | <i>Coding Sequence</i> (secuencia de codificación) |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CMI | Concentración Mínima Inhibitoria |
| dNTPs | <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> (desoxinucleótidos) |
| EGM | Elemento Genético Móvil |
| EUCAST | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| IEC | <i>Immune Evasion Cluster</i> (clúster de evasión del sistema inmune humano) |
| IS | <i>Insertion Sequence</i> (secuencia de inserción) |
| Kb | Kilobase (10 ³ pares de bases) |
| LPV | Leucocidina de Pantón-Valentine |
| LZD^R | Resistente a linezolid |
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of flight</i> (desorción/ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo) |
| min | Minutos |
| MLS | Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas |

| | |
|---------------------------|--|
| MLS_B | Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B |
| MLST | <i>Multilocus Sequence Typing</i> |
| MS_B | Macrólidos y estreptograminas B |
| pb | Pares de bases |
| PBP | <i>Penicillin Binding Protein</i> (proteína de unión a la penicilina) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa) |
| PFGE | <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de campo pulsado) |
| PhLOPS_A | <i>Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A</i> (fenicoles, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptogramina A) |
| PTSAg | <i>Pyrogenic Toxin Superantigens</i> (toxinas pirogénicas superantígeno) |
| QRDRs | <i>Quinolone Resistance Determining Region</i> (regiones determinantes de resistencia a quinolonas) |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| SARM/MRSA | <i>S. aureus</i> resistente a metilicina/ <i>Methicillin-resistant S. aureus</i> |
| SARM-AC | SARM asociado a la comunidad |
| SARM-AG/LA-MRSA | SARM asociado a ganado/ <i>livestock associated MRSA</i> |
| SARM-AH | SARM asociado al ámbito hospitalario |
| SASM/MSSA | <i>S. aureus</i> sensible a metilicina/ <i>Methicillin-susceptible S. aureus</i> |
| SCC_{mec} | <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (casete cromosómico estafilocócico del gen <i>mec</i>) |
| SCIN | Staphylococcal Complement Inhibitor (inhibidor del completo estafilocócico) |
| SCoN/CoNS | Staphylococcus coagulasa-negativo/ <i>Coagulase-negative staphylococci</i> |
| SCoNRM/MRCoNS | SCoN resistentes a metilicina/ <i>methicillin-resistant CoNS</i> |
| SCoP/CoPS | Staphylococcus coagulasa-positivo/ <i>Coagulase-positive staphylococci</i> |
| SE | <i>Staphylococcal Enterotoxins</i> (enterotoxinas estafilocócicas) |
| seg | Segundos |
| SERM/MRSE | <i>S. epidermidis</i> resistente a metilicina/ <i>methicillin-resistant S. epidermidis</i> |
| SIG | <i>S. intermedius</i> Group (grupo de <i>S. intermedius</i>) |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de nucleótido único) |
| spa | Staphylococcus protein A gene (gen de la proteína A de <i>Staphylococcus</i>) |
| spp. | Especies |
| SPRM/MRSP | <i>S. pseudintermedius</i> resistente a metilicina/ <i>Methicillin-resistant S. pseudintermedius</i> |
| SPSM | <i>S. pseudintermedius</i> sensible a metilicina |
| ST | Secuencia Tipo |
| TC | Transconjugante |
| TGH | Transferencia génica horizontal |

| | |
|-------------|--|
| Tn | Transposón |
| SaPI | <i>S. aureus pathogenicity island</i> (isla de patogenicidad de <i>S. aureus</i>) |
| TSST | Toxina del Síndrome del Shock Tóxico |
| UFC | Unidad Formadora de Colonias |
| WGS | <i>Whole Genome Sequencing</i> (secuenciación completa del genoma) |

Lista de tablas

Tabla 1. Especies pertenecientes al género *Staphylococcus* descritas hasta la fecha, divididas en función de su capacidad de producir la enzima coagulasa.

Tabla 2. Grupos filogenéticos en los que se divide el género *Staphylococcus* (Becker *et al.*, 2014).

Tabla 3. Especies de SCoN y principales especies animales donde se han detectado (Becker *et al.*, 2014).

Tabla 4. Alotipos de los genes *mec* descritos en *Staphylococcus* spp.

Tabla 5. Genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia codificados en algunos de los elementos genéticos móviles detectados en *Staphylococcus* spp.

Tabla 5. Genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia codificados en algunos de los elementos genéticos móviles detectados en *Staphylococcus* spp.

Tabla 6. Tipos de SCC*mec* descritos en SARM.

Tabla 7. Elementos genéticos móviles que han sido descritos dentro del SCC*mec* y genes de resistencia a antibióticos que portan.

Tabla 8. Principales diferencias entre las cepas SARM-AH y SARM-AC (Junie *et al.*, 2018).

Tabla 9. Mecanismos de resistencia a antibióticos más frecuentes en el género *Enterococcus* (Torres *et al.*, 2018).

Tabla 10. Discos de antibióticos empleados y diámetro del halo de inhibición establecidos para *Staphylococcus* spp.

Tabla 11. Discos de antibióticos empleados y diámetro del halo de inhibición establecidos para *Enterococcus* spp.

Tabla 12. Antibióticos utilizados para la técnica de microdilución y puntos de corte establecidos para *Staphylococcus* spp.

Tabla 13. Antibióticos utilizados para la técnica de microdilución y puntos de corte establecidos para *Enterococcus* spp.

Tabla 14. Reactivos y concentraciones utilizadas en la técnica de PCR.

Tabla 15. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para la identificación de las especies del SIG.

Tabla 16. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para el tipado *spa* de *S. aureus*.

Tabla 17. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizadas para el tipado por MLST de *S. aureus*.

Tabla 18. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizadas para el tipado por MLST de *S. pseudintermedius*.

Tabla 19. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizadas para el tipado por MLST de *S. epidermidis*.

Tabla 20. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *E. faecalis*.

Tabla 21. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *E. faecium*.

Tabla 22. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación del gen *sau1-hsdS1*.

Tabla 23. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para el tipado del *agr* de *S. aureus*.

Tabla 24. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para el tipado del *agr* de *S. pseudintermedius*.

Tabla 25. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación para el tipado del SCCmec con los cebadores de Kondo *et al.*, 2007.

Tabla 26. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación para el tipado del SCCmec con los cebadores de Zhang *et al.*, 2015.

Tabla 27. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a meticilina.

Tabla 28. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a penicilina y ampicilina.

Tabla 29. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

Tabla 30. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a aminoglucósidos.

Tabla 31. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a tetraciclinas.

Tabla 32. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes *gyrA*, *griA* y *parC* de las diferentes especies.

Tabla 33. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a fenicoles.

Tabla 34. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a oxazolidinonas.

Tabla 35. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del dominio V del ARNr 23S de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22.

Tabla 36. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a vancomicina.

Tabla 37. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *mupA*.

Tabla 38. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a ácido fusídico.

Tabla 39. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a trimetoprim.

Tabla 40. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de virulencia en *Staphylococcus* spp.

Tabla 41. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de virulencia en las cepas pertenecientes al SIG.

Tabla 42. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes del IEC.

Tabla 43. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *scneq*.

Tabla 44. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de integrasas de cinco familias de bacteriófagos.

Tabla 45. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *poxtA*.

Tabla 46. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *optrA*.

Tabla 47. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *cfrr* en la variante del Tn558 descrita en el plásmido pSCFS7.

Tabla 48. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *cfrr* en la variante del Tn558 descrita en el plásmido pSCFS3.

Tabla 49. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *cfrr* en el plásmido p12-02300 de *S. epidermidis* 12-02300.

Tabla 50. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *dfrK* en el transposón *Tn559*.

Tabla 51. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del clúster *tet(L)-dfrK*.

Tabla 52. Especies de aves silvestres donde fueron aisladas las cepas SCoP.

Tabla 53. Caracterización de las nueve cepas *S. aureus* aisladas de aves silvestres.

Tabla 54. Características de las 12 cepas *S. delphini* aisladas de aves silvestres.

Tabla 55. Diversidad de aislados de cada especie de SCoN en función de la especie animal analizada.

Tabla 56. Fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos de las 173 cepas SCoN aisladas de aves silvestres.

Tabla 57. Diversidad y frecuencia de especies de *Staphylococcus* aisladas de las muestras ambientales de la granja PI y PSE.

Tabla 58. Caracterización genética de las cuatro cepas *S. aureus* aisladas de la granja porcina PI.

Tabla 59. Fenotipo y genotipo de resistencia de los 68 SCoN aislados de las granjas PI y PSE.

Tabla 60. Características de las 23 cepas de *S. aureus* aisladas de procesos infecciosos de cerdos.

Tabla 61. Caracterización genética de las 28 cepas *S. pseudintermedius* y cinco *S. aureus* aisladas de procesos infecciosos de animales de compañía.

Tabla 62. Caracterización de los 18 *Staphylococcus* spp. LZD_R procedentes de hospitales españoles.

Tabla 63. Genotipo de resistencia a antibióticos y CMI a clindamicina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid de la cepa receptora, las cepas dadoras y los respectivos transconjugantes (TC).

Tabla 64. Características de las cepas *E. faecium* C10004 y C10009 LZD^R aisladas del aire de la granja PI.

Tabla 65. Genotipo de resistencia y CMI a tetraciclina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid de la cepa receptora, las cepas dadoras y los respectivos transconjugantes.

Tabla 66. Caracterización de los 13 *E. faecalis* LZD^R procedentes de hospitales españoles.

Tabla 67. Caracterización de los seis *E. faecium* LZD^R procedentes de hospitales españoles.

Tabla 68. Genotipo de resistencia a antibióticos y CMIs de la cepa receptora, las cepas dadoras y los respectivos transconjugantes.

Tabla 69. Genes codificantes de factores de virulencia identificados en las 244 cepas de *Staphylococcus* spp. de diferentes orígenes.

Tabla 70. Factores de virulencia detectados en las cepas de *Staphylococcus* spp. de esta tesis en función de su origen, y presencia de genes de integrasas asociadas a fagos.

Lista de figuras

Figura 1. Lista de patógenos prioritarios para los que es urgente encontrar nuevos antibióticos (OMS, 2017).

Figura 2. Conexiones de la resistencia a antibióticos según el enfoque *One Health* (Mcewen y Collignon, 2017).

Figura 3. Tasas de colonización por *S. aureus* en adultos en la población en general (izquierda) y en los portadores nasales de *S. aureus* (derecha) (Wertheim *et al.*, 2015).

Figura 4. Tasa de colonización por *S. pseudintermedius* en perros en función de la parte del cuerpo (Bannoerh *et al.*, 2012).

Figura 5. Principales dianas (izquierda) y mecanismos de resistencia a antibióticos (derecha) (Wright, 2010).

Figura 6. Estructura química del linezolid.

Figura 7. Representación de la organización del transposón Tn558 portador del gen *fexA*, y de las variantes encontradas en los plásmidos pSCFS3, pSCFS6 y pSCFS7 donde también se localiza el gen *cfr* (Shore *et al.*, 2010).

Figura 8. Organización y funcionamiento del locus *agr* en *S. aureus* (Ukpanah y Ulpa, 2017).

Figura 9. Estructura de los 13 tipos de SCCmec descritos hasta la fecha en SARM (Lakhundi y Zhang, 2018).

Figura 10 Distribución geográfica de los clones predominantes de SARM-AH, SARM-AC y SARM-AG (Aires-de-Sousa, 2017).

Figura 11. Porcentaje de aislados invasivos de SARM en Europa en el año 2018 (ECDC, 2019).

Figura 12. Origen y posible evolución de SARM-CC398 determinado mediante análisis filogenéticos (Price *et al.*, 2012).

Figura 13. Número de aves muestreadas de cada especie.

Figura 14. Distribución geográfica y temporal de la toma de muestras de aves silvestres.

Figura 15. Localización de los siete hospitales españoles donde se aislaron las cepas *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. resistentes a linezolid.

Figura 16. Combinación de genes de cada tipo IEC descrito.

Figura 17. Tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las cepas SCoN aisladas de aves silvestres.

Figura 18. Tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las cepas SCoN aisladas de la granja PI y PSE.

Figura 19. Tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las cepas SPSM, SPRM y en el total de *S. pseudintermedius*.

Figura 20. Comparación BLAST del entorno genético del gen *dfrK* identificado en la cepa *S. pseudintermedius* C5347 (GenBank FN677369) y la secuencia de referencia del transposón Tn559 de *S. aureus* (GenBank FN677369).

Figura 21. Comparación BLAST del entorno genético del gen *cfr* identificado en los aislados *S. equorum* X109 (GenBank MN642001) y *S. arlettae* X114 (GenBank MN637835) procedentes del aire de la granja porcina PI y la secuencia de referencia del plásmido pSP01 de *S. epidermidis* SP1 (GenBank KR230047).

Figura 22. Comparación BLAST del entorno genético del gen *cfr* en la cepa *S. aureus* X2063 de origen porcino y la secuencia de referencia del plásmido pSCFS7 de *S. aureus* (GenBank FR675942).

Figura 23 Comparación BLAST del entorno genético del gen *cfr* en la cepa X1761 de origen clínico y la secuencia de referencia del plásmido pSCFS3 de *S. aureus* (GenBank AM086211).

Figura 24. Plásmido de 38 864 pb detectado en la cepa *S. aureus* C9026 de origen clínico, donde se localizan los genes *cfr* y *fexA*.

Figura 25. Comparación BLAST del entorno genético del gen *poxtA* identificado en los aislados *E. faecium* C10004 y *E. faecium* C10009 (GenBank MN661250) procedentes del aire de la granja porcina PI y la secuencia de referencia de *E. faecium* P36 (GenBank KP834591).

Figura 26. Relación filogenética de las 13 cepas clínicas *E. faecalis* LZD^R basada en el análisis de SNPs usando CSI Phylogeny.

Figura 27. Comparación BLAST del entorno genético del gen *optrA* en las 13 cepas clínicas de *E. faecalis* LZD^R.

Figura 28. Entorno genético del gen *cfr(D)* en la cepa *E. faecalis* X528 de origen clínico.

Resumen

La salud humana, animal y ambiental están interconectadas, ya que todas ellas contribuyen a la emergencia, evolución y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, este problema debe ser abordado desde un enfoque "One Health". *Staphylococcus* spp., tanto coagulasa positivo (SCoP) como coagulasa negativo (SCoN), son bacterias comensales de la piel y mucosas de humanos y animales sanos, pero también pueden actuar como patógenos oportunistas, causando infecciones de diversa severidad. El objetivo de esta tesis fue analizar la frecuencia y diversidad de especies, y realizar la caracterización molecular de *Staphylococcus* spp. de diversos orígenes, incluyendo animales y medio ambiente, con especial atención a genes de resistencia a antibióticos y de virulencia emergentes o inusuales.

Se caracterizaron las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de muestras traqueales de 242 aves silvestres. Se detectó SCoP en el 8,3% de las aves estudiadas, y los aislados fueron identificados como *S. aureus* (n=9) y *S. delphini* (n=12). La gran mayoría de los *S. aureus* (n=7) fueron resistentes a meticilina (SARM), *mecC* positivos y del linaje CC130, pero se identificó también una cepa portadora del gen *mecA* perteneciente al CC398. El gen de virulencia *etd2* estuvo presente todas las cepas SARM-*mecC*, y el clúster de evasión del sistema inmune humano (IEC) tipo-E se identificó en dos de ellas. Las cepas *S. delphini* fueron sensibles a meticilina, pero todas mostraron resistencia al menos a uno de los antibióticos analizados, con tasas altas de resistencia a penicilina (75%) y tetraciclina (58%). Todos los aislados *S. delphini* portaban los genes de virulencia *lukS-I*, *siet*, y *se-int*. El 60% de las aves estudiadas eran portadoras de SCoN, y se recuperaron 173 cepas que pertenecían a 11 especies diferentes, con predominancia de *S. sciuri* (68,2%) y *S. lentus* (14,5%). El 34% de los SCoN mostraron un fenotipo de multiresistencia y se detectaron 42 cepas resistentes a meticilina (SCoNRM), portadoras del gen *mecA*. Dos cepas *S. sciuri* albergaban el gen de virulencia *tst*.

Se analizaron 72 cepas de *Staphylococcus* aisladas de muestras ambientales (aire y tanque de purines) de dos granjas porcinas, con producción intensiva (PI) y semiextensiva (PSE). Se aislaron cuatro cepas SARM y *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) del linaje CC398, de las muestras de aire de la granja PI. Respecto a los SCoN, 59 de las 68 cepas obtenidas (80%) fueron multiresistentes, y ocho cepas fueron SCoNRM, portadores del gen *mecA*. Las tasas de resistencia a 5 familias de antibióticos fueron significativamente más altas entre los aislados SCoN de la granja PI que en los de la granja PSE. Se identificó una cepa *S. simulans* portadora de los genes de la leucocidina de Pantone-Valentine (LPV) y tres cepas *S. cohnii* que albergaban el gen de virulencia *eta*. Dos cepas *S. equorum* o *S. arlettae* aisladas de la granja PI fueron resistentes a linezolid, y portaban portadoras el gen *cfr*.

Se investigaron las líneas genéticas y los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos 56 SCoP aislados de animales con signos de infección (cerdos y animales de compañía). Entre las cepas obtenidas de cerdos enfermos (23 *S. aureus*), se detectaron mayoritariamente cepas SARM-CC398, pero también otros clones asociados a ganado como SARM-CC9, siendo en su mayoría cepas multiresistentes (91%). Una cepa SARM CC398 resistente a linezolid de origen porcino portaba el gen *cfr*, colocalizado con *fexA* en una variante del Tn558. Entre las cepas de animales de compañía (cinco *S. aureus* y 28 *S. pseudintermedius*) se detectaron nueve cepas resistentes a meticilina *mecA* positivas

y entre las ocho cepas de *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina se identificaron los clones epidémicos ST71, ST68 y ST258. Las cepas *S. pseudintermedius* presentaron altas tasas de resistencia a penicilina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol (>50%), y todas ellas contenían los genes de virulencia *siet*, *se-int* y *lukS/F-I*. Entre las cinco cepas *S. aureus* se detectó una cepa SARM del linaje CC398 y cepas SASM de líneas genéticas asociadas a humanos (CC22 y CC5), portadoras de los genes de la LPV y el IEC; también se identificó una cepa SASM con un posible origen equino portadora de los genes *lukPQ* y *scneq*.

Por último, se realizó un estudio comparativo de los mecanismos de resistencia a linezolid en las cepas de origen animal y ambiental, con los presentes en muestras de origen clínico procedentes de distintos hospitales españoles. El gen *cfr* se detectó en dos cepas clínicas SARM portadoras del gen *mecA*: 1) una cepa SARM-CC398, aislada de una muestra nasal de un granjero, con los genes *cfr* y *fexA* localizados en una variante del transposón Tn558; 2) una cepa SARM, de una muestra faríngea, en la que se identificó el gen *cfr* junto con *fexA* en un plásmido conjugativo de 38864 pb. En el resto de las cepas clínicas (1 SASM Y 17 SCoN) la resistencia a linezolid estuvo mediada por mutaciones puntuales en el ARNr 23S (G2576T o C2534T) y/o cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales L3 y L4.

Esta tesis supone una aproximación *One Health* para entender la dinámica poblacional de *Staphylococcus* spp., así como el flujo de genes de resistencia y de virulencia, y la interacción de las bacterias de este género en los ámbitos humano, animal y ambiental.

Abstract

The human, animal and environmental health are interconnected, since all of them can contribute to the emergence, evolution and spread of antibiotic resistance. Hence, this problem must be addressed through a One Health approach. *Staphylococcus* spp., both coagulase-positive (CoPS) and coagulase-negative (CoNS), are commensal bacteria of the skin and mucous membranes of healthy humans and animals, but they can also act as opportunistic pathogens, causing diseases of diverse severity. The objective of this thesis was to analyze the frequency and diversity of species, and to perform the molecular characterization of *Staphylococcus* spp. of diverse origins, including animals and the environment, with special attention to emergent and unusual antibiotic resistance and virulence genes.

Staphylococcus spp. isolates recovered from tracheal samples of 242 wild birds were characterized. SCoP were recovered from 8.3% of wild birds tested, and the isolates were identified as *S. aureus* (n=9) and *S. delphini* (n=12). Most of *S. aureus* isolates (n=7) were methicillin-resistant (MRSA), *mecC*-positive and belonged to the lineage CC130, but a *mecA*-carrying CC398 isolate was also identified. The virulence gene *etd2* was present in all MRSA-*mecC* isolates, and the human immune evasion cluster (IEC) type E was identified in two of them. *S. delphini* isolates were methicillin-susceptible but showed resistance to at least one of the antimicrobials tested, with high penicillin (75%) and tetracycline (58%) resistance rates. All *S. delphini* isolates carried the virulence genes *lukS-I*, *siet* and *se-int*. The 60% of birds tested were CoNS-carriers, and 173 isolates were recovered, which belonged to 11 different species with predominance of *S. sciuri* (68.2%) and *S. lentus* (14.5%). The 34% of CoNS showed a multidrug resistance phenotype, and 42 *mecA*-carrying methicillin-resistant CoNS (MRCoNS) were detected. Two *S. sciuri* isolates harbored the virulence gene *tst*.

Seventy-two staphylococci recovered from environmental samples (air and liquid manure tank) of two pig farms, with intensive production (IP) and semiextensive production (SEP), were analyzed. Four MRSA and MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*) isolates of lineage CC398 were recovered from the air of the PI farm. Regarding CoNS, multidrug resistance was observed in 59 of the 68 isolates (80%), and eight *mecA*-MRCoNS isolates were identified. The rates of resistance for five groups of antimicrobial agents were significantly higher in CoNS isolates recovered from the IP farm in relation to those of SEP farm. One *S. simulans* isolate carrying the genes encoding the Pantone-Valentine leukocidin (PVL) and three *S. cohnii* harboring the virulence gene *eta* were identified. Two *S. equorum* or *S. arlettae* isolates recovered from the IP farm showed linezolid resistance and carried the *cfz* gene.

The genetic lineages and the antibiotic resistance and virulence genes of 56 CoPS recovered from animals with signs of infection (pigs and companion animals), were investigated. Among the isolates recovered from diseased pigs (23 *S. aureus*), a great prevalence of MRSA CC398 was detected, but other livestock associated genetic lineages, such as MRSA CC9, were also identified, most of them (91%) multiresistant isolates. One MRSA CC398 isolate of porcine origin showed linezolid resistance mediated by the *cfz* gene, which was co-located with the *fexA* gene in a Tn558 variant. Among the isolates recovered from companion animals (five *S. aureus* and 28 *S. pseudintermedius*), nine methicillin-resistant isolates (27%) carrying the *mecA* gene were detected, and the eight methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP), belonged to the epidemic clones ST71, ST68 and ST258. The *S.*

pseudintermedius isolates showed high penicillin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance rates (>50%), and all of them carried the *siet*, *se-int* and *lukS/F-I* virulence genes. Among the *S. aureus* isolates, a MRSA isolate ascribed to CC398 and MSSA isolates of human-associated genetic lineages (CC22 and CC5) carrying the PVL and IEC encoding genes were detected; a t10576-ST1660 SASM isolate of potential equine origin, harboring the *lukPQ* and *scneq* genes, was also identified.

Lastly, a comparative study on the mechanisms of linezolid resistance among the animal and environmental isolates, and those recovered from clinical samples of different Spanish hospitals, was performed. The *cfz* gene was detected in two clinical *mecA*-MRSA isolates: 1) one MRSA CC398 isolate, recovered from the nasal sample of a pig farmer, with the *cfz* and *fexA* genes located in a Tn558 variant; 2) one MRSA isolate, from a pharyngeal sample, with the *cfz* gene identified together with the *fexA* gene in a conjugative 38864 bp plasmid. In the remaining clinical isolates (one MSSA and 17 CoNS), linezolid resistance was mediated by point mutations in the rRNA 23S (G2576T or C2534T) and/or amino acid changes in the ribosomal proteins L3 and L4.

This thesis brings a One Health approach in order to understand the population dynamics of *Staphylococcus* spp., the antibiotic resistance and virulence genes flow, as well as the interaction among the bacteria of this genus in the human, animal and environmental settings.

Introducción



1. La problemática de la resistencia a los antibióticos y el enfoque *One Health*

El siglo XIX fue una época dorada en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos, lo que revolucionó el tratamiento de las infecciones bacterianas y supuso un gran impacto en la salud humana (Davies y Behroozian, 2020). La aparición de resistencia a antibióticos es un proceso que se produce habitualmente en las bacterias de forma natural tras un largo periodo de tiempo. Sin embargo, este proceso se ve agravado debido a la presión selectiva por el mal uso y abuso de los antibióticos en el ámbito humano, veterinario y agrícola. En la actualidad, la resistencia a los antibióticos está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los problemas más importantes de salud pública global. En los últimos años están emergiendo y se están diseminando nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos, comprometiendo las opciones terapéuticas disponibles para tratar infecciones bacterianas. Tanto es así, que actualmente no existe ningún antibiótico disponible para el que las bacterias no hayan desarrollado mecanismos de resistencia (Waglechner y Wright, 2017).

Actualmente se producen alrededor de 700.000 muertes al año por bacterias resistentes a antibióticos, pero se ha estimado que, si no se ponen en marcha políticas para evitar la diseminación de la resistencia, en el año 2050 se podrían producir hasta 10 millones de muertes (O’neill, 2016).

La rápida evolución y diseminación de bacterias multiresistentes (resistencia adquirida a al menos tres familias de antibióticos) y panresistentes (resistentes a todos los antibióticos disponibles) ha supuesto la imperiosa necesidad del desarrollo de nuevos antibióticos. Además, se están buscando terapias alternativas y combinadas a los antibióticos para tratar infecciones bacterianas, como el uso de bacteriófagos o de péptidos antimicrobianos. En el año 2017 la OMS publicó una lista con los patógenos prioritarios para los cuales es urgente encontrar nuevos antibióticos, ya que constituyen un riesgo creciente para la salud humana. En esta lista, que fue dividida en función de la prioridad, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) aparece en la categoría de prioridad alta (OMS, 2017) (Figura 1).

-
- Prioridad 1: Crítica**
- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
 - *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
 - *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectro extendido
- Prioridad 2: Elevada**
- *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina
 - *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
 - *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina
 - *Campylobacter* spp., resistente a las fluoroquinolonas
 - *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas
 - *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas
- Prioridad 3: Media**
- *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina
 - *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina
 - *Shigella* spp., resistente a las fluoroquinolonas

Figura 1. Lista de patógenos prioritarios para los que es urgente encontrar nuevos antibióticos (OMS, 2017).

La resistencia a los antibióticos es un problema con complejas interacciones entre diferentes ecosistemas (**Figura 2**), por lo que debe ser atajado mediante un enfoque coordinado y multisectorial, que es lo que se denomina concepto *One Health* (Mcewen y Collignon, 2017). El enfoque *One Health* es una estrategia de salud pública global que se basa en que la salud humana, animal y ambiental están interconectadas, y que todas contribuyen a la aparición, adquisición y diseminación de la resistencia a antibióticos. La resistencia a los antibióticos es el resultado de la confluencia de bacterias que colonizan diferentes huéspedes (humanos u otras especies animales) y el medio ambiente que comparten, donde los genes de resistencia a antibióticos pueden transferirse de unas bacterias a otras (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

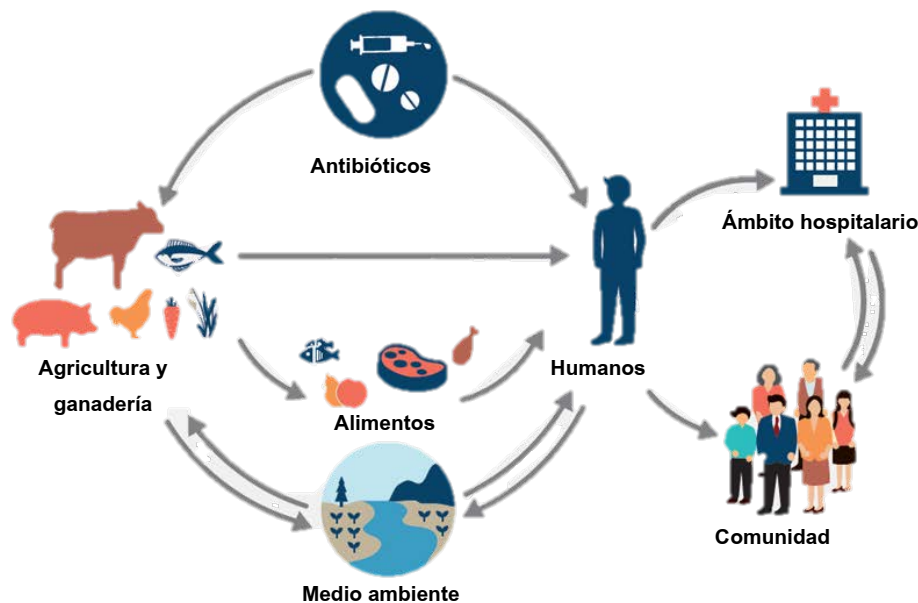


Figura 2. Conexiones de la resistencia a antibióticos según el enfoque *One Health* (Mcewen y Collignon, 2017).

Salvo algunas excepciones, la mayor parte de clases de antibióticos se usan en medicina humana y también en veterinaria (Mcewen y Collignon, 2017). En animales, los antibióticos pueden emplearse para tratar infecciones individuales y como profilaxis, pero también como promotores del crecimiento. El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en ganado se prohibió en la Unión Europea (UE) en el año 2006, pero sigue siendo una práctica común en numerosos países extracomunitarios. La *World Organization for Animal Health* (OIE) determinó que el 41% de los 146 países de los que se tienen datos acerca del uso de antibióticos en animales, permite su uso como promotores del crecimiento. Dentro de los antibióticos que se utilizan en producción ganadera, se encuentran varios que la OMS ha categorizado como críticos para la medicina humana, como fluoroquinolonas y macrólidos (OIE, 2017).

Una vez que los antibióticos son consumidos por vía oral, bien por los animales o por los humanos, estos pueden ser excretados junto con bacterias resistentes a antibióticos en las heces. La liberación en el medio ambiente de concentraciones subletales de antibióticos procedentes de las aguas residuales de los hogares y hospitales, y de la escorrentía de la agricultura y ganadería, así como el contacto directo de las comunidades bacterianas naturales y las bacterias resistentes, está conduciendo a la selección de bacterias resistentes a antibióticos en el medio natural. El medio natural a su vez puede

actuar de reservorio de bacterias resistentes que pueden ser transmitidas al ganado, a la fauna silvestre o a los humanos mediante el contacto directo o indirecto (Silva *et al.*, 2020).

2. El género *Staphylococcus*. Características generales

En 1880 el cirujano Sir Alexander Ogston determinó que cocos agrupados en forma de racimo eran la causa de abscesos supurativos en humanos. Fue dos años más tarde cuando dio nombre al género *Staphylococcus*, el cual proviene de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokkus* (gránulo) (Missiakas y Schneewind, 2018).

Tabla 1. Especies pertenecientes al género *Staphylococcus* descritas hasta la fecha, divididas en función de su capacidad de producir la enzima coagulasa.

| | | | |
|--|--------------------------------|-------------------------------|--|
| <i>Staphylococcus</i> coagulasa-positivo (SCoP) | <i>S. agnetis</i> ^a | <i>S. delphini</i> | <i>S. pseudintermedius</i> |
| | <i>S. argenteus</i> | <i>S. hyicus</i> ^a | <i>S. schweitzeri</i> |
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> |
| | <i>S. cornubiensis</i> | <i>S. lutrae</i> | |

| | | | |
|--|--------------------------------|-------------------------------|---|
| <i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativo (SCoN) | <i>S. agnetis</i> ^a | <i>S. felis</i> | <i>S. piscifermentans</i> |
| | <i>S. argensis</i> | <i>S. fleurettii</i> | <i>S. pseudoxylosum</i> |
| | <i>S. arlettae</i> | <i>S. gallinarum</i> | <i>S. rostri</i> |
| | <i>S. auricularis</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. saccharolyticus</i> |
| | <i>S. caeli</i> | <i>S. hominis</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
| | <i>S. capitis</i> | <i>S. hyicus</i> ^a | <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> |
| | <i>S. caprae</i> | <i>S. kloosii</i> | <i>S. sciuri</i> |
| | <i>S. camosus</i> | <i>S. lentus</i> | <i>S. simiae</i> |
| | <i>S. chromogenes</i> | <i>S. lugdunensis</i> | <i>S. simulans</i> |
| | <i>S. cohnii</i> | <i>S. massiliensis</i> | <i>S. stepanovicii</i> |
| | <i>S. condimenti</i> | <i>S. microti</i> | <i>S. succinus</i> |
| | <i>S. debuckii</i> | <i>S. muscae</i> | <i>S. vitulinus</i> |
| | <i>S. devriesei</i> | <i>S. nepalensis</i> | <i>S. ursi</i> |
| | <i>S. edaphicus</i> | <i>S. pasteurii</i> | <i>S. warneri</i> |
| | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. petrasii</i> | <i>S. xylosum</i> |
| | <i>S. equorum</i> | <i>S. pettenkoferi</i> | |

^aLas especies *S. hyicus* y *S. agnetis* son consideradas coagulasa variable.

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae* y al orden *Bacillales*. Son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos y catalasa positivos. Actualmente, el género *Staphylococcus* está formado por 55 especies diferentes divididas en dos grupos en función de su

capacidad de producir la enzima coagulasa y, por lo tanto, de coagular el plasma sanguíneo: *Staphylococcus* coagulasa-positivo (SCoP) y *Staphylococcus* coagulasa-negativo (SCoN) (Tabla 1).

2.1. *Staphylococcus* coagulasa-positivo (SCoP)

El grupo de SCoP incluye las especies *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. cornubiensis*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. argenteus*, *S. schweitzeri*, y las especies coagulasa variable *S. hyicus* y *S. agnetis*.

2.1.1. *S. aureus*

S. aureus forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas de humanos (Figura 3). Aunque *S. aureus* puede colonizar muchas partes del cuerpo, el principal lugar de colonización es la cavidad nasal, estando aproximadamente un 20% de la población colonizada permanentemente por *S. aureus*, un 60% colonizada intermitentemente y el 20% restante nunca está colonizada. La colonización nasal es un factor de riesgo para la infección por *S. aureus*, ya que se ha observado que con frecuencia las cepas causantes de infección son las mismas cepas nasales de los pacientes. *S. aureus* también coloniza la piel de personas sanas, especialmente la zona de las manos y el perineo (Laux *et al.*, 2019; Wertheim *et al.*, 2005) (Figura 3).

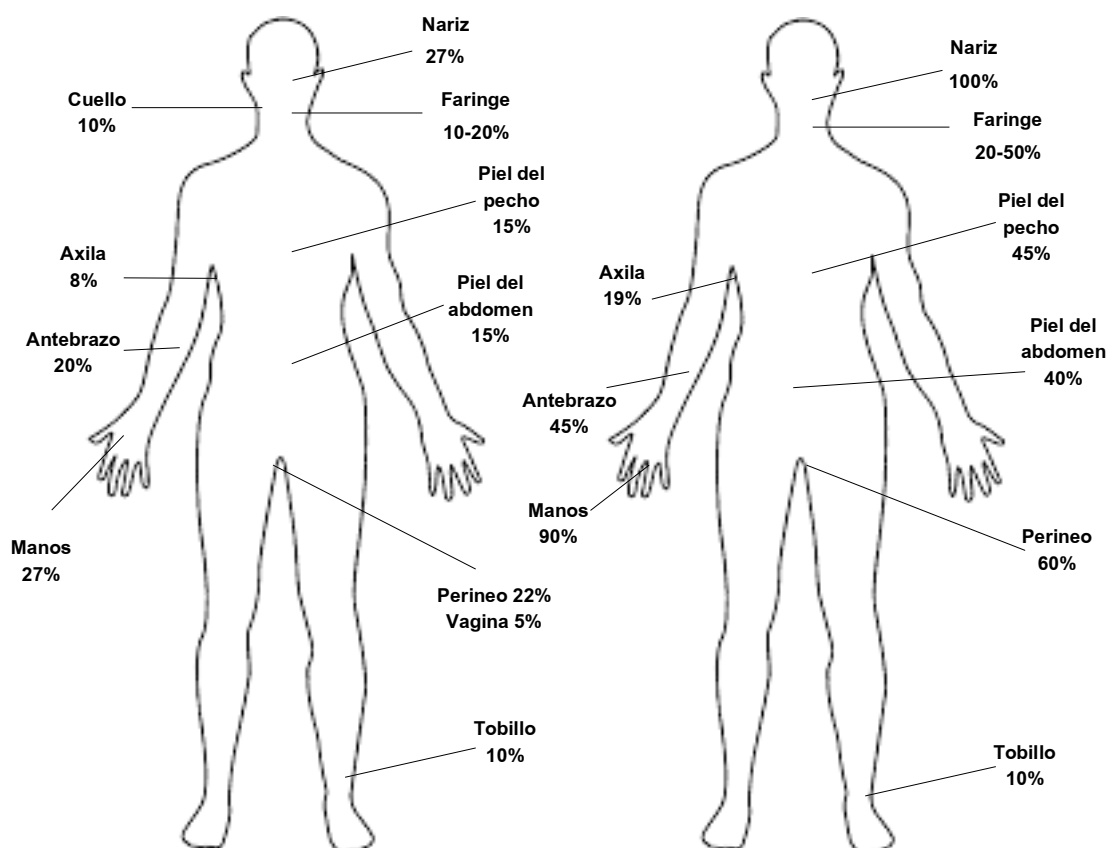


Figura 3. Tasas de colonización por *S. aureus* en adultos en la población en general (izquierda) y en los portadores nasales de *S. aureus* (derecha) (Wertheim *et al.*, 2005).

Sin embargo, *S. aureus* también es un importante patógeno oportunista humano siendo uno de los agentes etiológicos más importantes causantes de infecciones nosocomiales y de infecciones asociadas a la comunidad. *S. aureus* es capaz de producir un enorme arsenal de factores de virulencia que contribuyen a la severidad de la enfermedad, por lo que ésta puede ser desde leve a mortal, incluyendo neumonía, endocarditis e infecciones de piel y partes blandas (IPPB). Además, también es capaz de producir infecciones relacionadas con la producción de toxinas como el síndrome del shock tóxico, intoxicaciones alimentarias y el síndrome de piel escaldada estafilocócica (Lee *et al.*, 2018).

Esta especie también coloniza un amplio número de hospedadores animales, especialmente mamíferos, pero también aves y peces. La tasa de colonización por *S. aureus* en animales varía en función de la especie; en aves de corral la tasa de colonización es de hasta un 90%, mientras que en cerdos y en ovejas son de aproximadamente 40% y 30%, respectivamente (Heaton *et al.*, 2020). Normalmente, los clones de *S. aureus* que se detectan en animales son diferentes a los que colonizan humanos. Sin embargo, en el caso de los animales de compañía, donde la tasa de colonización es de alrededor del 10% (van Duijkeren *et al.*, 2011), las cepas suelen ser de origen humano ya que en muchas ocasiones se transmiten de los dueños a sus mascotas (Haag *et al.*, 2019). En animales, *S. aureus* también es capaz de producir un amplio número de enfermedades, destacando la mastitis en rumiantes (Aires-de-Sousa, 2017).

2.1.2. Grupo *S. intermedius*

Además de *S. aureus*, dentro de SCoP tiene especial importancia el grupo *S. intermedius* (SIG). Tradicionalmente, este grupo estaba compuesto por las especies estrechamente relacionadas *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*. Sin embargo, recientemente se han descrito dos nuevos integrantes del SIG, denominados *S. cornubiensis* y *S. ursi* (Murray *et al.*, 2018; Perreten *et al.*, 2020). La única descripción de *S. cornubiensis* procede de una muestra clínica en Reino Unido. *S. cornubiensis* se encuentra más relacionada con la especie *S. intermedius*, con la que comparte una similitud del 90,2% del genoma núcleo (Murray *et al.*, 2018). Por otro lado, *S. ursi* ha sido descrita en el año 2020 en una muestra cutánea de un oso. Esta especie ha sido incluida en el SIG por su relación filogenética, aunque es una especie no productora de coagulasa (Perreten *et al.*, 2020).

El gen ARNr 16S de las especies del SIG *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini* tiene más de un 99% de similitud, por lo que los métodos microbiológicos de diagnóstico convencionales no sirven para su diferenciación. Por ello, se desarrollaron varios métodos relacionados con la secuenciación del gen *sodA* o *hsp60* (Kizerwetter-Świda *et al.*, 2015), así como una PCR multiplex basada en la amplificación y digestión del gen *nuc* (Sasaki *et al.*, 2010). Actualmente, para la identificación de las especies de este grupo se está utilizando la espectrometría de masas MALDI-TOF, pero algunos autores han descrito problemas para la diferenciación de las especies de SIG con esta técnica (Murugaiyan *et al.*, 2014).

Debido a esta similitud entre *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*, hasta el año 2005 estas especies eran erróneamente identificadas como *S. intermedius* (Sasaki *et al.*, 2007).

S. pseudintermedius

S. pseudintermedius es el principal colonizador de la piel y membranas mucosas de animales de compañía, especialmente perros, aunque también ha sido descrito en otras especies animales como jabalíes y burros (Gharsa *et al.*, 2015; Mama *et al.*, 2019b). Las tasas de colonización en perros sanos varían en función de la parte del cuerpo (**Figura 4**) (Rubin y Chirino-Trejo, 2011). Esta especie también se encuentra implicada frecuentemente en infecciones oportunistas, siendo el principal agente etiológico de IPPB, otitis e infecciones del tracto urinario en perros (Bergot *et al.*, 2018; Pires Dos Santos *et al.*, 2016).

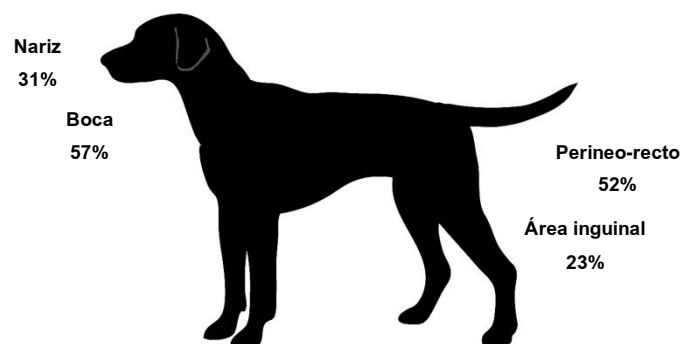


Figura 4. Tasa de colonización por *S. pseudintermedius* en perros en función de la parte del cuerpo (Bannoerh *et al.*, 2012).

La colonización nasal por *S. pseudintermedius* en humanos es menor del 1%, pero se incrementa hasta el 4,5% en personas que conviven con perros (Gómez-Sanz *et al.*, 2013c). En los últimos años han aumentado las descripciones de *S. pseudintermedius* causantes de infecciones en humanos, incluyendo IPPB, neumonía y bacteriemia (Lozano *et al.*, 2017; Somayaji *et al.*, 2016a). Comúnmente, estas infecciones están asociadas con el contacto con perros, lo que sugiere una transmisión zoonótica, ya que además se han detectado patrones similares de PFGE en las cepas *S. pseudintermedius* aisladas de los perros y sus dueños (Lozano *et al.*, 2017; Pires Dos Santos *et al.*, 2016; Somayaji *et al.*, 2016a).

S. pseudintermedius resistente a meticilina (SPRM), mediada generalmente por el gen *mecA*, se ha convertido en un problema importante en el ámbito veterinario. Además, SPRM suele presentar un fenotipo de multiresistencia lo que limita las opciones terapéuticas para los veterinarios (van Duijkeren *et al.*, 2011). En animales de compañía sanos se han descrito tasas de prevalencia de SPRM de alrededor del 2%, mientras que en animales enfermos está entre 10% y 20% (Duim *et al.*, 2016; Haenni *et al.*, 2014; Worthing *et al.*, 2018), aunque varían considerablemente dependiendo de la región geográfica. Sin embargo, la tasa de resistencia a meticilina aumenta hasta un 60% en cepas aisladas de pioderma canino (Kawakami *et al.*, 2010). Durante la última década se ha producido un aumento de la prevalencia de SPRM en todo el mundo debido a la diseminación de diferentes clones, como el clon ST71 en Europa, ST68 en EE.UU. y ST45/ST112 en Asia, aunque actualmente estos clones se encuentran diseminados por todo el mundo (Bergot *et al.*, 2018; Pires Dos Santos *et al.*, 2016; Somayaji *et al.*, 2016; Worthing *et al.*, 2018).

S. pseudintermedius tiene una gran capacidad patogénica y es capaz de producir diferentes factores de virulencia, algunos de ellos funcionalmente relacionados con los factores de virulencia producidos por *S. aureus*, incluyendo enzimas como coagulasa y proteasa, y numerosas toxinas como toxinas exfoliativas, leucocidinas y enterotoxinas (van Duijkeren *et al.*, 2011).

S. delphini

La especie *S. delphini* fue descrita en una lesión en la piel de delfines en el año 1988 (Varaldo *et al.*, 1988). Desde entonces, se ha detectado en un amplio número de especies animales, principalmente como colonizador pero también como agente causante de infección, incluyendo mustélidos, caballos, burros, palomas y pingüinos (Gary *et al.*, 2014; Gharsa *et al.*, 2015; Kizerwetter- Świda *et al.*, 2015; Mama *et al.*, 2019a; Mundbjerg *et al.*, 2020; Vrbovska *et al.*, 2020). Recientemente se ha descrito el primer caso de una infección producida por *S. delphini* en humanos con un posible origen zoonótico (Magleby *et al.*, 2019).

S. delphini generalmente presenta gran sensibilidad a antibióticos (Gharsa *et al.*, 2015; Mama *et al.*, 2019a; Nowakiewicz *et al.*, 2016), aunque existen algunas descripciones de resistencia a penicilina, eritromicina y tetraciclina (Martins *et al.*, 2013; Nikolaisen *et al.*, 2017). Hasta la fecha, solo se han descrito cepas *S. delphini* resistentes a meticilina en muestras de carne de pollo en Brasil (Martins *et al.*, 2013). Esta especie está poco documentada debido a que en el pasado los aislados *S. delphini* y *S. pseudintermedius* eran erróneamente clasificados como *S. intermedius* y han sido reclasificados posteriormente mediante técnicas moleculares (Sasaki *et al.*, 2007). El análisis filogenético del gen *nuc* puso de manifiesto que la especie *S. delphini* puede dividirse en dos clústeres genéticamente diferentes: *S. delphini* grupo A y *S. delphini* grupo B. Los aislados que pertenecen al grupo B están más relacionados filogenéticamente con la cepa de referencia *S. pseudintermedius* LMG 22219 que con *S. delphini* LMG 22190 (Sasaki *et al.*, 2007)

S. delphini también puede ser portadora de diferentes factores de virulencia estrechamente relacionados con *S. pseudintermedius*, incluyendo leucocidinas, enterotoxinas y toxinas exfoliativas (Gharsa *et al.*, 2015).

2.2. *Staphylococcus coagulasa-negativo (SCoN)*

SCoN es un grupo muy heterogéneo que comprende principalmente especies comensales de la piel y mucosas de humanos y otros animales. El grupo SCoN está formado por más de 40 especies que, en base al análisis filogenético de cuatro genes constitutivos, junto con diversos aspectos clínicos y de diagnóstico, se dividen en diferentes grupos (Becker *et al.*, 2014) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Grupos filogenéticos en los que se divide el género *Staphylococcus* (Becker *et al.*, 2014).

| Grupo | Muscae | Hyicus | Intermedius | Aureus | Epidermidis |
|-----------------|-------------------|-----------------------|----------------------------|------------------|---------------------------|
| | <i>S. muscae</i> | <i>S. hyicus</i> | <i>S. intermedius</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> |
| | <i>S. microti</i> | <i>S. agnetis</i> | <i>S. delphini</i> | <i>S. simiae</i> | <i>S. capitis</i> |
| Especies | <i>S. rostri</i> | <i>S. chromogenes</i> | <i>S. lutrae</i> | | <i>S. caprae</i> |
| | | <i>S. felis</i> | <i>S. pseudintermedius</i> | | <i>S. saccharolyticus</i> |
| | | | <i>S. schleiferi</i> | | |

| Grupo | Warneri | Haemolyticus | Lugdunensis | Auricularis | Simulans-Carnosus |
|-----------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | <i>S. warneri</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>S. lugdunensis</i> | <i>S. auricularis</i> | <i>S. simulans</i> |
| | <i>S. pasteurii</i> | <i>S. devriesei</i> | | | <i>S. carnosus</i> |
| Especies | | <i>S. hominis</i> | | | <i>S. condimentii</i> |
| | | <i>S. jettensis</i> | | | <i>S. piscifermentans</i> |
| | | <i>S. petrasii</i> | | | |
| Grupo | Cohnii-Nepalensis | Saprophyticus | Pettenkoferi-Massiliensis | Arllettae-Kloosii | Sciuri |
| | <i>S. cohnii</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. pettenkoferi</i> | <i>S. arlettae</i> | <i>S. sciuri</i> |
| | <i>S. nepalensis</i> | <i>S. equorum</i> | <i>S. massiliensis</i> | <i>S. kloosii</i> | <i>S. fleurettii</i> |
| Especies | | <i>S. gallinarum</i> | | | <i>S. lentus</i> |
| | | <i>S. succinus</i> | | | <i>S. stepanovicii</i> |
| | | <i>S. xylosus</i> | | | <i>S. vitulinus</i> |

Existen especies de SCoN asociadas a humanos o animales, aunque cada vez con más frecuencia muchas de las especies de SCoN tradicionalmente relacionadas con animales se detectan en humanos, y viceversa (Heilmann *et al.*, 2019) (**Tabla 3**).

Tradicionalmente se ha considerado SCoN como un grupo con menos potencial patogénico que SCoP, pero en la última década han sido reconocidos como importantes agentes causantes de infecciones nosocomiales (Heilmann *et al.*, 2019). Además, algunos de los factores de virulencia estrechamente asociados con *S. aureus*, como la leucocidina de Pantón-Valentine, la toxina del síndrome del shock tóxico o las toxinas exfoliativas, se han detectado en SCoN de diferentes orígenes (Bertelloni *et al.*, 2015; Giormezis *et al.*, 2014; Ünal y Çınar, 2012).

Uno de los aspectos más remarcables de SCoN, es su rápida capacidad para evolucionar y ocupar nichos vacíos, especialmente en el ámbito hospitalario. Este grupo está compuesto por especies que tienen desde un potencial patogénico nulo, a especies con bajo, medio o incluso alto potencial virulento. La única especie considerada con alto potencial virulento es *S. lugdunensis*, las especies *S. epidermidis* y *S. haemolyticus* tienen un potencial patogénico medio, mientras que otras están consideradas no patogénicas, como *S. carnosus* (Heilmann *et al.*, 2019). Solo algunas de las especies de SCoN han sido aisladas de infecciones humanas. Las especies más prevalentes a nivel clínico forman parte de la microbiota nasal normal de individuos sanos, siendo *S. epidermidis* la más frecuente, seguido de *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warneri* y *S. lugdunensis* (Kaspar *et al.*, 2016). Estas especies son las aisladas con más frecuencia en infecciones de implantes médicos, aunque también se han detectado causando otro tipo de infecciones, como endocarditis (Heilmann *et al.*, 2019).

La importancia de SCoN en medicina veterinaria es mucho menor que en medicina humana, aunque se han publicado diferentes casos de mastitis en rumiantes, y dermatitis y endocarditis en aves de corral (Pyörälä y Taponen, 2009; Pyzik *et al.*, 2019; Ünal y Çınar, 2012).

Una de las características más importantes de SCoN es su gran capacidad para adquirir genes de resistencia a antibióticos. Además, el uso de estos como terapia y profilaxis ha causado una gran presión selectiva, provocando la emergencia y diseminación de SCoN resistentes a meticilina (SCoNRM) y multiresistentes. Muchos estudios han postulado a los SCoN como reservorio de genes de resistencia a antibióticos. Estos genes suelen encontrarse localizados en elementos genéticos móviles que, por lo tanto, podrían ser transferidos a bacterias consideradas más patogénicas como *S. aureus*, por transferencia génica horizontal (Becker *et al.*, 2014; Heilmann *et al.*, 2019). En este sentido, las especies que pertenecen al grupo *S. sciuri* (*S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. fleurettii*, *S. lentus* y *S. stepanovicii*) (Tabla 2) tienen una especial importancia por su papel en el origen, evolución y diseminación del gen *mecA* (Tsubakishita *et al.*, 2010).

Tabla 3. Especies de SCoN y principales especies animales donde se han detectado (Becker *et al.*, 2014).

| Especie | Huésped natural | Especie | Huésped natural |
|------------------------|--|-------------------------|---|
| <i>S. arlettae</i> | Aves, cabras, vacas, cerdos, ovejas | <i>S. kloosii</i> | Cabras |
| <i>S. auricularis</i> | Humanos | <i>S. lentus</i> | Cabras, ovejas, caballos, cerdos, visón, aves |
| <i>S. capitis</i> | Humanos, gatos, perros, caballos | <i>S. lugdunensis</i> | Humanos, cabras, gatos, perros, chinchillas |
| <i>S. carnosus</i> | Vacas | <i>S. nepalensis</i> | Cabras, cerdos, ardillas, monos |
| <i>S. chromogenes</i> | Vacas, caballos, cabras, cerdos, ovejas | <i>S. pasteurii</i> | Cerdos |
| <i>S. cohnii</i> | Humanos, primates, aves, perros, cabras, caballos | <i>S. saprophyticus</i> | Humanos, vacas, cerdos, caballos, cabras, ovejas, gatos |
| <i>S. epidermidis</i> | Humanos, gatos, vacas, perros, cabras, caballos, cerdos, ovejas, gorilas | <i>S. sciuri</i> | Humanos, vacas, cabras, perros, roedores, ballenas, delfines, gatos, caballos, insectívoros, marsupiales, monos, cerdos |
| <i>S. equorum</i> | Caballos, vacas, cabras, ovejas | <i>S. simulans</i> | Humanos, vacas, caballos, ovejas |
| <i>S. fleurettii</i> | Cabras, cerdos, pequeños mamíferos | <i>S. succinus</i> | Insectívoros, roedores, vacas, aves |
| <i>S. haemolyticus</i> | Humanos, gatos, perros, vacas, caballos, cabras, cerdos, ovejas | <i>S. vitulinus</i> | Caballos, aves |
| <i>S. hominis</i> | Humanos, gatos, perros, cabras, cerdos, ovejas | <i>S. warneri</i> | Humanos, primates, perros, gatos, cabras, caballos, insectívoros, cerdos, roedores, ovejas |
| <i>S. hyicus</i> | Cerdos, caballos | <i>S. xylosus</i> | Humanos, roedores, aves, gatos, cabras, caballos, insectívoros, primates, ovejas |

3. Factores de virulencia y capacidad de evasión del sistema inmune humano en *Staphylococcus*

La patogenicidad del género *Staphylococcus* se basa en la presencia y capacidad de expresión de una gran cantidad de factores de virulencia que facilitan la supervivencia, la multiplicación de la bacteria, la evasión del sistema inmune del hospedador y contribuyen a la severidad de las infecciones.

Como se ha comentado anteriormente, *S. aureus* es la especie más virulenta de este género y es capaz de producir algunas enzimas que facilitan la colonización e invasión, como la coagulasa, catalasa, termonucleasa, hialuronidasa o lipasa.

A continuación, se resumen los factores de virulencia más importantes en *Staphylococcus*. spp.

Leucocidinas

Las leucocidinas son una familia de potentes toxinas formadas por dos proteínas designadas como subunidades F y S, que son producidas y secretadas de forma separada. Se han descrito diferentes leucocidinas en *Staphylococcus*, incluyendo LukPV, LukI, LukPQ y LukED (Abouelkhair *et al.*, 2018).

Una de las toxinas más importantes de *S. aureus* es la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV). Esta leucocidina pertenece a la familia de las toxinas sinergohimenotrópicas y está formada por las subunidades adyacentes *lukS*-PV y *lukF*-PV que actúan de forma sinérgica en las membranas celulares. Los genes codificantes de la LPV se encuentran en bacteriófagos de la familia Siphoviridae. Hasta la fecha, se han descrito al menos 13 bacteriófagos que codifican la LPV en *S. aureus*: Φ PVL, Φ SLT, Φ Sa2mw, Φ Sa2USA300, Φ SLTUSA300_TCH1516, Φ 108PVL, Φ tp310-1, Φ IND772PVL, Φ 2985PVL, Φ 7247PVL, Φ 5967, Φ 7401 y Φ M013 (Bakthavatchalam *et al.*, 2017). La LPV actúa induciendo la lisis de los leucocitos polimorfonucleares humanos, especialmente los neutrófilos, a través de la formación de poros (Bakthavatchalam *et al.*, 2017). Aunque todavía existe controversia acerca del papel de la LPV en las enfermedades estafilocócicas en determinados modelos animales (Shallcross *et al.*, 2013; Wardenburg *et al.*, 2008), diferentes estudios han sugerido que contribuye a la severidad de ciertas patologías, especialmente neumonía necrotizante e IPPB recurrentes o virulentas (Gijón *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). La LPV se encuentra en un bajo porcentaje (alrededor del 5%) en las cepas de *S. aureus* clínicas, pero está estrechamente relacionada con SARM asociado a la comunidad.

La leucocidina LukED ha mostrado que tiene actividad citolítica contra los leucocitos y las células sanguíneas de conejos, y también se ha descrito como la única toxina capaz de destruir los fagocitos de ratones con alta eficiencia. La leucocidina LukED está ampliamente distribuida entre las cepas de *S. aureus* (Oliveira *et al.*, 2018).

La leucocidina Luk-I, codificada por los genes *lukS*-I y *lukF*-I, es la análoga a la LPV en las especies del SIG. Se ha demostrado que tiene una gran acción leucotóxica frente a las células polimorfonucleares, pero solo una ligera actividad hemolítica en los eritrocitos de conejo (Futagawa-Saito *et al.*, 2004a).

LukPQ es una leucocidina formada por las subunidades *lukS*-PQ y *lukF*-PQ codificada en el bacteriófago Φ Saeq1, junto con la variante inhibidor del completo estafilocócico adaptada a equinos (*scneq*) (de Jong *et al.*, 2018). Esta leucocidina tiene una alta toxicidad frente a los neutrófilos equinos, pero en concentraciones altas también es capaz de lisar los neutrófilos bovinos y, en menor medida, los neutrófilos humanos (Koop *et al.*, 2017).

Toxinas pirogénicas superantígeno

La toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1) pertenece al grupo denominado toxinas pirogénicas superantígeno (PTSAg), las cuales provocan una activación y proliferación masiva de las

células T en el huésped, dando lugar a la liberación de citoquinas celulares que resultan muy tóxicas (Andrey *et al.*, 2010; Lappin y Ferguson, 2009). Está codificada por el gen *tst*, que se localiza en diferentes islas de patogenicidad estafilocócicas (Alibayov *et al.*, 2014). La TSST-1 es causante del síndrome del shock tóxico (SST) estafilocócico, con un cuadro clínico caracterizado por fiebre elevada, erupciones cutáneas, dolor de cabeza, hipotensión y trastornos gastrointestinales, entre otros (Lappin y Ferguson, 2009). Aunque alrededor del 20% de las cepas de *S. aureus* albergan el gen codificante de esta toxina, el SST no es común, por lo que se ha sugerido que la expresión de este gen está fuertemente regulada por diferentes mecanismos moleculares (Andrey *et al.*, 2010).

Dentro de las PTSAg también se encuentran 18 enterotoxinas estafilocócicas (SEs) (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU). Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, siendo responsables de las intoxicaciones alimentarias producidas por *S. aureus* (Oliveira *et al.*, 2018).

En las especies del SIG se ha descrito la enterotoxina canina tipo C (SEC_{canine}) y la enterotoxina SE-INT, que tienen una identidad del 95% y 61% con la enterotoxina SEC producida por *S. aureus*, respectivamente (Futagawa-Saito *et al.*, 2004b; Ross Fitzgerald, 2009).

Toxinas exfoliativas

Las toxinas exfoliativas son serina proteasas que actúan destruyendo los enlaces peptídicos que se forman en los dominios extracelulares de la desmogleína 1, provocando la desestabilización de los queratinocitos del estrato granuloso en la epidermis (Oliveira *et al.*, 2018). Estas toxinas son causantes de patologías como el síndrome de la piel escaldada estafilocócica o el impétigo.

Las toxinas exfoliativas más importantes son EtA, EtB y EtD, codificadas por los genes *eta*, *etb* y *etd*, respectivamente. Aproximadamente un 10% de las cepas de *S. aureus*, son productoras de toxinas exfoliativas (Bukowski *et al.*, 2010), siendo EtA la más prevalente en Europa, África y América, y EtB en Japón (Oliveira *et al.*, 2018). Otras toxinas exfoliativas como EtC y EtE solo han sido detectadas en cepas *S. aureus* de caballos y ovejas, respectivamente (Imanishi *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2018).

En las especies de SIG se han descrito tres toxinas exfoliativas, SIET, ExpA y ExpB, que tienen un papel importante en las infecciones de la piel en perros (Börjesson *et al.*, 2015).

Hemolisinas

Las hemolisinas son proteínas que producen principalmente la lisis de eritrocitos y toxicidad en otras líneas celulares. Se han descrito cinco hemolisinas en *S. aureus*: hemolisina α (*hla*), hemolisina β (*hlb*), hemolisina Δ (*hld*), hemolisina γ (*hlg*) y hemolisina γ -variante (*hlg_v*). Estas toxinas están presentes en la mayor parte de las cepas de *S. aureus*, debido, en gran medida, a que se localizan en regiones muy estables del ADN cromosómico (Kaneko y Kamio, 2004).

La hemolisina α es la más importante y la más estudiada por su actividad dermonecrótica y neurotóxica en las células de diferentes especies animales, especialmente en los eritrocitos de conejos (Dinges *et al.*, 2000). La hemolisina β actúa degradando la esfingomielina, presente en las membranas celulares de los eritrocitos. La hemolisina Δ es capaz de causar daños en la membrana de una amplia

variedad de células, pero su función en la patogénesis es todavía desconocida (Verdon *et al.*, 2009). La hemolisina γ es una toxina bicomponente que tiene actividad hemolítica y leucotóxica principalmente en eritrocitos y, en menor medida, en neutrófilos y macrófagos (Dinges *et al.*, 2000). Se pueden dar dos combinaciones de esta toxina en función de las proteínas que se combinen (HlgAB y HlgCB).

Formación de biofilm

La formación de biofilm en el género *Staphylococcus* está regulada por la expresión del polisacárido de adherencia intercelular (PIA), que está compuesto por poli-N-acetil β -1,6 glucosamina, y que es responsable de la adhesión célula a célula necesaria para la formación de biofilm. PIA está codificado por el locus cromosómico *ica*, compuesto por los genes *icaADBC* y el gen regulador *icaR* (Kord *et al.*, 2018).

Elemento móvil para el catabolismo de la arginina (ACME)

El ACME es una isla genética de entre 31 y 34 kb que contiene al menos 33 genes, incluyendo los clústeres de los genes *arc* y *opp3*. El clúster *arc* está compuesto por los genes *arcABCD*, que codifican proteínas de la vía de la deaminación de la arginina, mientras que el clúster del gen *opp3* (*opp-3A*, *opp-3B*, *opp-3C*, *opp-3D* y *opp-3E*) codifica sistemas de transportador ABC (Shore *et al.*, 2011b).

Clúster de evasión del sistema inmune humano (IEC)

El sistema IEC se basa en la expresión de diferentes proteínas encargadas de la inactivación y/o inhibición de algunos de los moduladores del sistema inmune innato humano, lo que le permite a *S. aureus* sobrevivir en los primeros estadios de colonización o infección (Verkaik *et al.*, 2011). Actualmente existen siete tipos diferentes de IEC (desde el tipo A al tipo G) en función de la combinación de los genes *scn*, *chp*, *sak*, *sea* y *sep* (Van Wamel *et al.*, 2006), los cuales tienen diferentes funciones para la supervivencia de *S. aureus*.

Los genes del IEC están localizados en bacteriófagos de la familia 3 (Φ 3) o también denominados fagos convertidores de la hemolisina β , ya que se incorporan en el gen *h1B*, quedando este truncado a efectos de expresión (Verkaik *et al.*, 2011). La presencia de estos bacteriófagos es habitual en las líneas genéticas de *S. aureus* adaptadas a humanos, mientras que en las asociadas a animales es poco frecuente (Jung *et al.*, 2017).

El inhibidor del complejo estafilocócico (SCIN) codificado por el gen *scn*, es el componente imprescindible para la consideración de la presencia del IEC. El SCIN bloquea la acción fagocítica de los neutrófilos humanos sobre *S. aureus* (Rooijackers *et al.*, 2005). La proteína CHIPS, codificada por el gen *chp*, inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos (Postma *et al.*, 2004). SAK, codificada por el gen *sak*, es una estafiloquinasa que, al convertir el plasminógeno en plasmina, favorece la inactivación de las opsoninas previniendo la fagocitosis de *S. aureus* por los neutrófilos. Además, también se ha demostrado su papel como bloqueador de las α -defensinas (Rooijackers *et al.*, 2005). Las enterotoxinas

estafilocócicas A (SEA) y P (SEP) son superantígenos que podrían tener un efecto sinérgico con el resto de los mecanismos del IEC (Rahimpour *et al.*, 1999).

4. Dianas y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus*

Se pueden diferenciar distintos grupos de antibióticos en función de sus dianas en las bacterias (**Figura 5**), entre los que destacan aquellos que actúan inhibiendo (Wright, 2010):

- La síntesis de la pared celular.
- La síntesis de la membrana celular.
- La síntesis del ADN/ARN.
- La síntesis proteica.
- Rutas metabólicas.

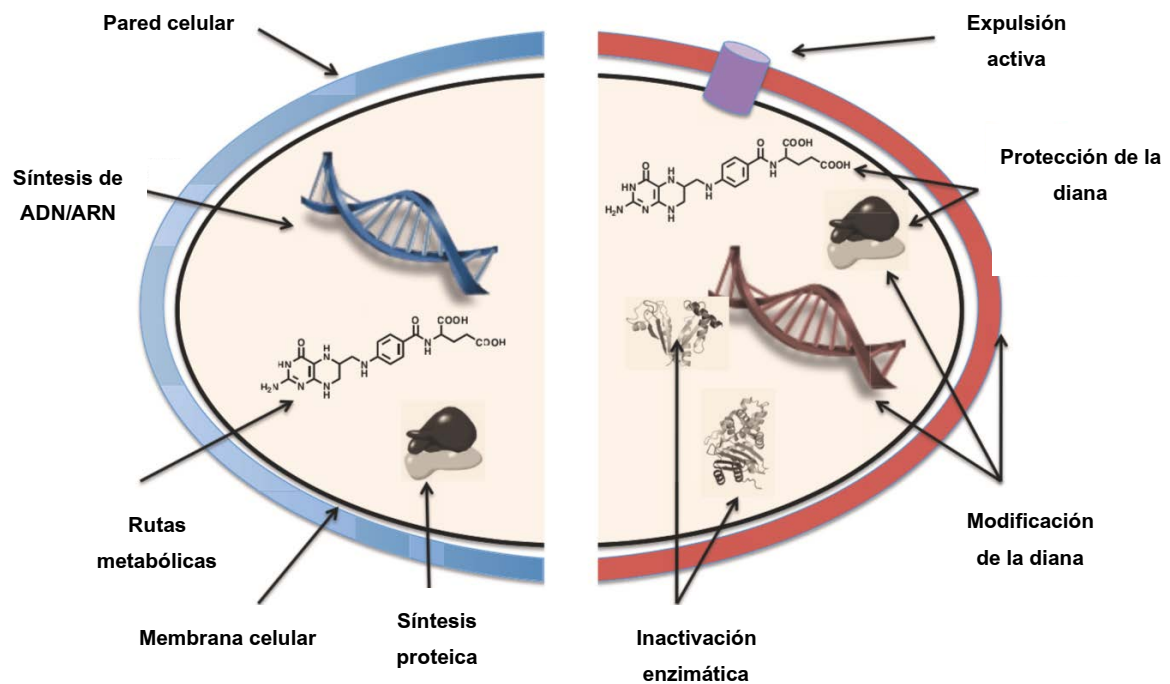


Figura 5. Principales dianas (izquierda) y mecanismos de resistencia a antibióticos (derecha) (Wright, 2010).

Las bacterias del género *Staphylococcus* son capaces de adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos desarrollando diferentes mecanismos de resistencia (**Figura 5**), que pueden resumirse en (Wright, 2010):

- Modificación de la diana.
- Protección de la diana.
- Expulsión activa del antibiótico al exterior de la bacteria.

- Inhibición o inactivación enzimática del antibiótico.

A continuación, se detallan las familias de antibióticos más importantes en estafilococos, las dianas específicas y los mecanismos de resistencia que las bacterias de este género han desarrollado, con especial atención al linezolid, que pertenece al grupo de las oxazolidinonas.

4.1. Antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos, como la penicilina, oxacilina, meticilina y cefoxitina, inhiben la síntesis de la pared celular al unirse a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs, *Penicillin Binding Proteins*). Las PBPs son enzimas que participan en el entrecruzamiento de las hebras de peptidoglicano de la pared celular. Los antibióticos β -lactámicos aprovechan su homología con el sustrato natural de las PBPs, el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina, para unirse a ellas inhibiéndolas de forma irreversible. Las cepas del género *Staphylococcus* poseen cuatro tipos de PBPs nativas: PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4. La PBP1, PBP2 y PBP3 tienen función transpeptidasa y la PBP2 también posee función transglicosilasa. La PBP4 participa en los procesos de división, remodelado y reciclado de peptidoglicano (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018).

Los mecanismos de resistencia a β -lactámicos en *Staphylococcus* incluyen la inactivación enzimática o la modificación de la diana.

La inactivación enzimática se debe a la acción de penicilinasas, codificadas por el gen *blaZ*, que son enzimas β -lactamasas capaces de hidrolizar la penicilina. El gen *blaZ* está ampliamente distribuido en las cepas de *S. aureus* (Schwarz *et al.*, 2018).

La modificación de la diana está mediada por los productos de los genes *mec*, que confieren resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, exceptuando las cefalosporinas de 5^o generación. El término "resistente a meticilina" se utiliza para referirse a las cepas portadoras de alguno de los genes *mec* y que, por lo tanto, son resistentes a casi todos los antibióticos β -lactámicos.

El gen *mecA* codifica una PBP adicional, denominada PBP2a, que tiene baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos comparada con las PBPs nativas, ya que la configuración de su sitio activo es menos accesible al antibiótico (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018). El gen *mecA* se localiza en un elemento genético móvil denominado casete cromosómico estafilocócico (SCC*mec*, *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). Se ha sugerido que este gen puede tener su origen en SCoN, especialmente en el grupo *S. sciuri*, ya que en las especies de este grupo se han detectado diferentes alotipos del gen *mecA* (Tabla 4) (Tsubakishita *et al.*, 2010).

En el año 2011 se detectó una nueva variante del gen *mecA*, denominada *mecA*_{LGA251} y más tarde *mecC*, que estaba localizado en el nuevo tipo de SCC*mec* XI. Este gen produce una PBP2c que también tiene baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos. El gen *mecC* tiene una identidad del 70% con el gen *mecA* (García-Álvarez *et al.*, 2011) (Tabla 4), por lo que los métodos usados para la detección del *mecA* no servían para detectar el *mecC*. Además de en *S. aureus*, el gen *mecC* y varios alotipos han sido descritos en cepas de SCoN (Harrison *et al.*, 2013; Loncaric *et al.*, 2019a; MacFadyen *et al.*, 2019; Małyszko *et al.*, 2014).

En el año 2018, se describió un nuevo determinante de resistencia a meticilina en *S. aureus* denominado *mecB*. Este gen fue descrito por primera vez en la especie *Macrococcus caseolyticus* bajo la denominación *mecA_m*. Hasta la fecha, en el género *Staphylococcus* solamente se ha detectado en una cepa *S. aureus* de una muestra nasofaríngea de un paciente que aparentemente no presentaba signos de infección. El gen *mecB* se localizaba en el plásmido de 85 kb pSAWWU4229_1 (GenBank PRJEB19527), flanqueado por genes reguladores de β -lactamasas similares a *mecR*, *mecI*, y *blaZ* (Becker *et al.*, 2018).

Tabla 4. Alotipos de los genes *mec* descritos en *Staphylococcus* spp.

| Gen | Cepa de referencia | Tamaño (pb) | Identidad nucleotídica con el gen <i>mecA</i> de <i>S. aureus</i> N315 |
|--------------|----------------------------------|-------------|--|
| <i>mecA</i> | <i>S. aureus</i> N315 | 2007 | - |
| <i>mecA1</i> | <i>S. sciuri</i> K11 | 2001 | 79,1% |
| <i>mecA2</i> | <i>S. vitulinus</i> CSBO8 | 2007 | 91% |
| <i>mecB</i> | <i>S. aureus</i> UKM4229 | 2025 | 62,1% |
| <i>mecC</i> | <i>S. aureus</i> LGA251 | 1998 | 68,7% |
| <i>mecC1</i> | <i>S. xylosus</i> S04009 | 1995 | 68,9% |
| <i>mecC2</i> | <i>S. saprophyticus</i> 210 | 1998 | 69,3% |
| <i>mecC3</i> | <i>S. caeli</i> 82B ^T | 1998 | 69,6% |

4.2. Antibióticos no β -lactámicos

Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS)

Los MLS son tres grupos de antibióticos con estructura química diferente pero que comparten mecanismos de acción y de resistencia. Dentro del grupo de los macrólidos y las lincosamidas, la eritromicina y la clindamicina, respectivamente, son los antibióticos más representativos.

Estas familias de antibióticos actúan a nivel de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la translocación de la cadena peptídica en la síntesis proteica (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Los mecanismos de resistencia se dividen en:

- Modificación de la diana debido a la acción de metilasas, codificadas por los genes *erm*, y en menor medida por el gen *cfr*.
- Expulsión activa del antibiótico de la célula mediada por los genes *msr(A)*, *vga(A)*, *Isa(A)*, *Isa(B)* y *Isa(E)*, entre otros.
- Inactivación del antibiótico por la acción de enzimas codificadas por los genes *Inu(A)*, *Inu(B)* y *mph(C)*.

El fenotipo de resistencia combinada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B) se basa en la presencia de genes *erm* de las clases A, B, C, T y 43, entre otros. Estos genes codifican metilasas que modifican el sitio diana A2058/A2059 en el ARNr 23S y, por lo tanto, inhiben la unión de estos antibióticos (Feßler *et al.*, 2018b).

El gen de resistencia más frecuente que confiere el fenotipo de resistencia a macrólidos y estreptograminas B (MS_B) es el gen *msr(A)*, el cual codifica un transportador de la familia ABC-F (Feßler *et al.*, 2018b).

La resistencia a macrólidos puede estar mediada por la fosfotransferasa *mph(C)*, que confiere resistencia de bajo nivel a macrólidos. En ocasiones está ligado al gen *msr(A)*, confiriendo resistencia de más alto nivel a macrólidos (Feßler *et al.*, 2018b).

Los genes *lnu(A)* y *lnu(B)* codifican nucleotidiltransferasas que confieren resistencia a lincosamidas. El gen *lsa(B)*, que codifica un transportador de la familia ABC, confiere sensibilidad reducida a lincosamidas (Feßler *et al.*, 2018b).

Aminoglucósidos

Estos antibióticos se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano bloqueando la actividad normal del complejo de iniciación, impidiendo la síntesis proteica y provocando una lectura errónea del ARNm (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

En el género *Staphylococcus*, el mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más frecuente se debe a la presencia de enzimas modificantes que inactivan el antibiótico. El gen *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia codifica una enzima bifuncional que tiene actividad acetiltransferasa y fosfotransferasa, que confiere resistencia a tobramicina, gentamicina y kanamicina y, cuando está sobre-expresada, también a amikacina. El gen *ant(4'')*-Ia codifica una adeniltransferasa que confiere resistencia a tobramicina, kanamicina y neomicina. La fosfotransferasa *aph(3'')*-IIIa media la resistencia a kanamicina, neomicina y amikacina. Los genes *ant(6'')*-Ia y *str* codifican adeniltransferasas, que confieren resistencia a estreptomina (Schwarz *et al.*, 2018).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas inhiben la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, impidiendo así el acceso del aminoacil ARNt al sitio aceptor en el complejo ARNm-ribosoma (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia a tetraciclinas que son la expulsión activa del antibiótico mediante bombas de eflujo pertenecientes a la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) codificadas por los genes *tet(K)* y *tet(L)*, y la producción de proteínas de protección ribosomal que codifican los genes *tet(O)* y *tet(M)*. Los genes *tet(K)* y *tet(L)* confieren resistencia a todas las tetraciclinas excepto a minociclina, mientras que el gen *tet(M)* también confiere resistencia a este antibiótico (Schwarz *et al.*, 2018).

La enzima de protección ribosomal PoxTA, también confiere resistencia a tetraciclinas (Antonelli *et al.*, 2018).

Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino y el levofloxacino, actúan inhibiendo la replicación del ADN mediante la inactivación de la ADN girasa (codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*) y de la ADN

topoisomerasa IV (codificada por los genes *griA* y *griB*), que son esenciales para la multiplicación bacteriana. El principal mecanismo de resistencia a esta familia de antibióticos son las mutaciones que conducen a cambios aminoacídicos en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDRs) de uno o más de los genes que codifican la ADN girasa y ADN topoisomerasa IV. Los cambios aminoacídicos más frecuentes en *S. aureus* relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas son S84L y S80F en las proteínas GyrA y GriA, respectivamente (Feßler *et al.*, 2018b).

Fenicoles

Los fenicoles actúan bloqueando la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la enzima peptidil transferasa y, por lo tanto, evitando la formación de los enlaces peptídicos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

La resistencia a fenicoles puede ser debida a: a) la inactivación enzimática mediada por las cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) codificadas por los genes *cat_{PC194}*, *cat_{PC221}* y *cat_{PC223}*, b) expulsión activa del antibiótico mediante transportadores de la superfamilia MFS, codificados por los genes *fexA* y *fexB*, c) modificación de la diana por la acción de la metilasa *cfr* (Schwarz *et al.*, 2018), o d) protección ribosomal por la acción de proteínas de la superfamilia ABC, como *OprA* y *PoxTA* (Antonelli *et al.*, 2018).

Los genes CAT confieren resistencia exclusivamente a fenicoles no fluorados, como el cloranfenicol. Por el contrario, las proteínas pertenecientes a la superfamilia MFS confieren resistencia a fenicoles no fluorados y fluorados (cloranfenicol y florfenicol) (H. Liu *et al.*, 2012). Los genes *cfr*, *optrA* y *poxTA*, confieren resistencia a fenicoles y otras familias de antibióticos.

Trimetoprim

El trimetoprim interfiere en la síntesis del ácido fólico al inhibir la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa. El ácido fólico es un precursor esencial de varios aminoácidos y nucleótidos, por lo que su inhibición paraliza la síntesis de ADN (Feßler *et al.*, 2018b).

En estafilococos, la resistencia a trimetoprim más frecuente se atribuye a la expresión de dihidrofolato reductasas adicionales codificadas por los genes *dfrA* (también denominado *dfrS1*), *dfrD*, *dfrG* o *dfrK*.

Ácido fusídico

El ácido fusídico inhibe la síntesis proteica al unirse al factor de elongación G (FE-G) impidiendo que sea liberado del ribosoma (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

La resistencia a ácido fusídico se debe a la expresión de los genes de resistencia *fusB* y *fusC*, que codifican proteínas citoplasmáticas que se unen al FE-G y lo protegen de la acción del antibiótico, así como la modificación de la diana por la presencia de mutaciones puntuales en el gen codificante del FE-G (*fusA*) (O'Neill *et al.*, 2007). Además, los genes *fusD* y *fusF* se encuentran en el cromosoma de *S. saprophyticus* y *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, respectivamente, confiriéndoles resistencia intrínseca a este antibiótico (Hung *et al.*, 2015).

Mupirocina

La mupirocina actúa inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse a la enzima aminoacil ARNt sintetasa, impidiendo la incorporación del aminoácido isoleucina a la cadena peptídica (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Se han descrito dos mecanismos de resistencia a mupirocina. La resistencia de bajo nivel se relaciona con mutaciones puntuales en el gen codificante de la isoleucil-ARNt-sintetasa (*ileS*). La resistencia de alto nivel está asociada a la presencia del gen *mupA* que codifica variantes funcionales de esta enzima (Schwarz *et al.*, 2018).

Glucopéptidos

Los glucopéptidos, como la vancomicina y la teicoplanina, inhiben la síntesis de la pared celular al impedir la transglicosilación y transpeptidación llevada a cabo por la PBP2 y la PBP2a (Schwarz *et al.*, 2018).

La presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la vancomicina, mediada por el gen *vanA*, es muy poco frecuente. Sin embargo, la resistencia intermedia a vancomicina en *S. aureus* es más común, y se produce por mutaciones cromosómicas que provocan un engrosamiento de la pared celular, limitando el acceso de la vancomicina a su diana (Schwarz *et al.*, 2018).

4.3. Oxazolidinonas

El linezolid es el primer antibiótico de la familia de las oxazolidinonas que fue aprobado para su uso clínico en el año 2000 en EE. UU. bajo el nombre comercial de Zyvox[®]. En Europa se aprobó en el año 2001. Se trata de un antibiótico sintético (**Figura 6**) y bacteriostático, considerado en muchas ocasiones como último recurso en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos Gram-positivos multiresistentes, incluyendo SARM, SCoNRM y enterococos resistentes a vancomicina. Sin embargo, las bacterias Gram-negativas presentan resistencia intrínseca a linezolid (Bialvaei *et al.*, 2017). En el año 2014 se aprobó para su uso clínico un nuevo miembro de la familia de las oxazolidinonas, el tedizolid (Locke *et al.*, 2014). El linezolid está aprobado únicamente para su uso hospitalario y está prohibido en animales de producción.

El linezolid actúa inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano interfiriendo con la correcta acomodación del N-formil-metionil-ARNt en el centro peptidil-transferasa (CPT). La unión con la subunidad 50S se produce por interacción con el ARNr 23S, y más concretamente con ocho nucleótidos universalmente conservados [G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 y U2585 (numeración de *Escherichia coli*)], y con las proteínas ribosomales que se encuentran más próximas al sitio de unión, la L3, L4 y L22. La unión del linezolid al ribosoma causa rigidez en el nucleótido U2585, el cual normalmente presenta una flexibilidad molecular que es vital para el posicionamiento correcto del ARNt en el sitio P del CPT y, como consecuencia, el antibiótico produce una interrupción temprana de la síntesis de péptidos (Wilson *et al.*, 2008).

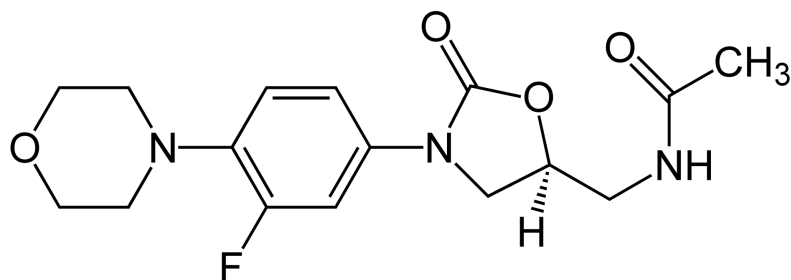


Figura 6. Estructura química del linezolid.

Aunque el linezolid todavía resulta efectivo contra más del 99% de las bacterias Gram-positivas, en los últimos años se ha observado un aumento de los patógenos resistentes a este antibiótico en el ámbito clínico y ganadero (Gu *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2018, 2016; Pfaller *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015a, 2015b).

Actualmente, los mecanismos de resistencia a linezolid están relacionados con la presencia de mutaciones y cambios aminoacídicos, y con la adquisición de genes de resistencia.

Resistencia a linezolid por mutaciones en el sitio diana

El mecanismo de resistencia a linezolid más frecuente en estafilococos y enterococos está relacionado con mutaciones puntuales en el dominio V del ARNr 23S, las cuales inhiben la unión del linezolid al ribosoma. Se han descrito diferentes mutaciones relacionadas con la resistencia a linezolid (p. ej.: T2500A, C2192T y C2534T), pero la más común es G2576T (numeración *E. coli*) (Bender *et al.*, 2015; Bi *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2013). El ARNr está codificado por los genes del operón *rrn*, el cual se presenta en diferente número de copias en las bacterias. Las mutaciones en ARNr 23S pueden presentarse en una, algunas o todas las copias y, se ha observado, que existe una correlación directa entre el número de copias mutadas y la sensibilidad a linezolid. Una vez que se adquiere la mutación en una de las copias, las mutaciones en los restantes alelos se producen rápidamente por el efecto de la recombinación homóloga. La presencia de mutaciones en el ARNr 23S conlleva la disminución del *fitness* bacteriano, y se ha observado una relación inversa entre el número de copias mutadas y la capacidad de crecimiento de la bacteria (Besier *et al.*, 2008). Las mutaciones puntuales en el ARNr 23S se relacionan con la exposición y un tratamiento prolongado con linezolid, aunque también se ha demostrado que, en ausencia de la presión selectiva del antibiótico, la resistencia mutacional a linezolid es reversible e inestable (Meka *et al.*, 2004).

Los cambios aminoacídicos, inserciones y deleciones en las proteínas ribosomales L3, L4, y L22, codificadas por los genes *rplC*, *rplD*, y *rplV*, respectivamente, también se han relacionado con la sensibilidad reducida a linezolid. Los cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales no están completamente caracterizados, de forma que hay diferentes cambios como L101V en la proteína L4, que también se detectan en cepas sensibles a linezolid por lo que no parecen tener relación con la sensibilidad a este antibiótico (Bender *et al.*, 2015).

Resistencia a linezolid por adquisición de genes de resistencia

Hasta la fecha se han descrito cinco genes de resistencia a linezolid en *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp.: *cfr*, *cfr(B)*, *cfr(D)*, *optrA* y *poxtA*. Estos genes de resistencia se localizan normalmente en elementos genéticos móviles junto con otros genes de resistencia, especialmente con aquellos que confieren resistencia a fenicoles, provocando una coselección de resistencias, facilitando su diseminación e incrementando su importancia epidemiológica.

El gen *cfr* codifica una ARNr metiltransferasa que produce la metilación en el carbono 8 del nucleótido A2503 del dominio V del ARNr 23S. Este gen fue inicialmente descrito en el plásmido pSCFS1 de *S. sciuri* de origen bovino (Schwarz *et al.*, 2000), y posteriormente en diferentes especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de diversos orígenes (Shen *et al.*, 2013). Además de a linezolid, el gen *cfr* también confiere resistencia a diferentes antibióticos cuya diana es el ribosoma bacteriano, como son fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina A (fenotipo PhLOPS_A). También se ha demostrado que reduce la sensibilidad de los antibióticos del grupo de los macrólidos que poseen 16 átomos de carbono (espiramicina y josamicina) (Smith y Mankin, 2008). Sin embargo, este gen no afecta a la sensibilidad al tedizolid (Bialvaei *et al.*, 2017). Aunque se ha descrito integrado en el cromosoma bacteriano (Kehrenberg *et al.*, 2007), el gen *cfr* normalmente se localiza en plásmidos en variantes del transposón Tn558, como las que se encuentran en los plásmidos pSCFS3, pSCFS6 y pSCFS7 (Figura 7). En *Enterococcus* spp. el gen *cfr* se describió por primera vez en el año 2011 en China en una cepa *E. faecalis* procedente de heces de animales bovinos (Y. Liu *et al.*, 2012). Al contrario que en estafilococos, las descripciones del gen *cfr* en enterococos son escasas.

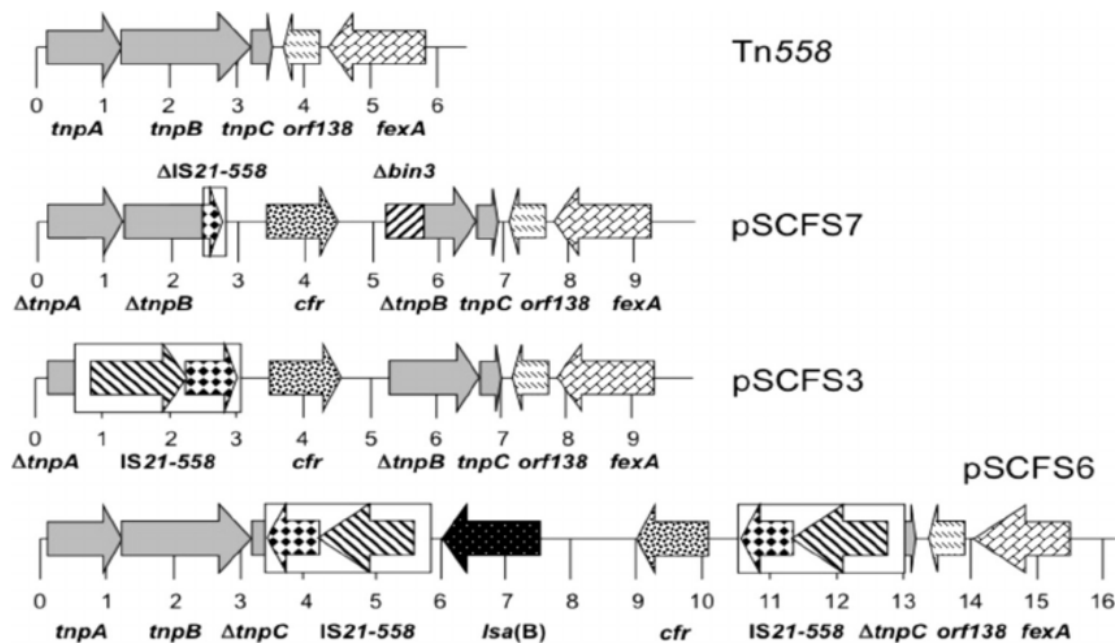


Figura 7. Representación de la organización del transposón Tn558 portador del gen *fexA*, y de las variantes encontradas en los plásmidos pSCFS3, pSCFS6 y pSCFS7 donde también se localiza el gen *cfr* (Shore *et al.*, 2010).

Recientemente, se han descrito dos variantes del gen *cfr* en *Enterococcus* spp.: *cfr(B)* y *cfr(D)*. Estos genes se detectaron por primera vez en aislados clínicos de *Peptoclostridium difficile*, y

posteriormente en cepas *E. faecium* de origen clínico en países europeos, EE.UU. y Australia (Bender *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2015; Guerin *et al.*, 2020; Pang *et al.*, 2020). Cfr(B) y Cfr(D) tienen una identidad aminoacídica del 75% y del 64% con la proteína Cfr del plásmido pSCFS1, respectivamente (Deshpande *et al.*, 2015; Guerin *et al.*, 2020).

El gen *optrA* pertenece a la familia de las proteínas ABC-F de protección ribosomal y confiere resistencia a oxazolidinonas y a fenicoles. El gen *optrA* fue descrito en *E. faecalis* y *E. faecium* de origen humano y animal en China (Wang *et al.*, 2015b), y después en diferentes especies de Gram-positivos, incluyendo *S. sciuri* (Li *et al.*, 2016). Se ha detectado tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos conjugativos (He *et al.*, 2016). En varias ocasiones se ha descrito el gen *optrA* en combinación con otros genes de resistencia a linezolid, tanto en enterococos como en estafilococos (Li *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2018).

Al igual que *Optra*, *PoxTA* es una proteína tipo ABC-F involucrada en la protección ribosomal. El gen *poxTA* fue descrito por primera vez en la cepa *S. aureus* AOUC-0915 de origen clínico en Italia (Antonelli *et al.*, 2018) y reduce la sensibilidad a fenicoles, oxazolidinonas y tetraciclinas. Este gen ha sido detectado en *Enterococcus* spp. en diferentes países, incluido España (Moure *et al.*, 2020). En muchas ocasiones, el gen *poxTA* ha sido identificado en el transposón compuesto Tn6246, junto con el gen *fexB* (Freitas *et al.*, 2020).

5. Elementos de adquisición y diseminación de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia

El genoma bacteriano, también denominado pangenoma, consta del genoma núcleo y del genoma accesorio. El genoma núcleo contiene todos los genes vitales para la supervivencia del organismo presentes en todas las cepas de una misma especie, como genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo, en la síntesis de ADN y ARN o en la replicación. El genoma accesorio determina la diversidad bacteriana entre especies y se trata de genes que permiten a la bacteria adaptarse a diferentes nichos y condiciones ambientales, como genes de resistencia antibióticos y metales pesados, factores de virulencia o mecanismos de adaptación al huésped (Malachowa y Deleo, 2010; Partridge *et al.*, 2018).

Los mecanismos de resistencia a antibióticos y los determinantes de virulencia pueden ser transferidos de una bacteria a otra mediante transferencia génica horizontal (TGH) por los procesos de conjugación, transducción y transformación. La TGH suele ocurrir entre bacterias de la misma especie o género, aunque también se ha demostrado que puede ocurrir entre diferentes géneros bacterianos.

La conjugación es el proceso de transmisión de ADN de una la célula dadora a una receptora que se encuentran en contacto directo, permitiendo el intercambio de ADN protegido por estructuras especializadas. Este método de transferencia ocurre en la mayoría de los géneros bacterianos y requiere maquinaria conjugativa. La transducción involucra la transferencia de ADN a una célula por la infección de un bacteriófago. Por último, la transformación es la adquisición de material genético libre. Para la adquisición de ADN mediante transformación, las células necesitan desarrollar la fase fisiológica de

competencia. En algunas especies, como *S. aureus*, se ha demostrado la existencia de transformación natural (Cafini *et al.*, 2017).

Estos mecanismos de TGH están mediados por elementos genéticos móviles (EGMs). Los EGMs son fragmentos de ADN que contienen genes que suponen una ventaja adaptativa para las bacterias, así como genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de transferencia e integración de estos genes dentro del propio genoma o entre diferentes bacterias (**Tabla 5**) (Malachowa and Deleo, 2010). En el género *Staphylococcus* existen diversos tipos de EGMs, incluyendo plásmidos, transposones, secuencias de inserción, islas de patogenicidad, bacteriófagos, y casetes cromosómicos estafilocócicos. Hay que destacar que la expresión de la mayor parte de los genes codificados en estos EGMs se regulan por parte del genoma núcleo (Malachowa y Deleo, 2010; Partridge *et al.*, 2018).

Tabla 5. Genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia codificados en algunos de los elementos genéticos móviles detectados en *Staphylococcus* spp.

| Tipo de EGM | EGM | Genes de resistencia o virulencia |
|-------------------------|---------------|--------------------------------------|
| Plásmidos | pT181 | <i>tet(K)</i> |
| | pC221 | <i>cat_{pC221}</i> |
| | pUB110 | <i>ant(4['])-Ia</i> |
| | pKKS2187 | <i>dfrK</i> , <i>tet(L)</i> |
| | pETB, pRW0001 | <i>etb</i> |
| Elementos transponibles | Tn552 | <i>blaZ</i> |
| | Tn559 | <i>dfrK</i> |
| | Tn558 | <i>fexA</i> |
| | Tn4003 | <i>dfrA</i> |
| | Tn916 | <i>tet(M)</i> |
| | IS256, IS1216 | <i>cfr</i> |
| Fagos | ΦETA | <i>eta</i> |
| | ΦPVL | <i>lukS/F-PV</i> |
| | Φ13 | <i>scn</i> , <i>sak</i> , <i>chp</i> |
| | Φ6390 | <i>sak</i> |
| Isla de patogenicidad | SaPI1 | <i>tst</i> |

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN con capacidad de auto-replicarse que, en estafilococos, pueden tener un tamaño que oscila desde 2 a más de 100 kb (Schwarz *et al.*, 2014). Una vez dentro de la bacteria huésped, los plásmidos se pueden mantener como ADN libre recircularizado o como ADN linearizado integrado en el cromosoma. Las cepas de *Staphylococcus* tienen normalmente uno o más plásmidos con un contenido variado ya que, además de genes de resistencia a antibióticos, también suelen portar genes de resistencia a diferentes metales pesados como cadmio o mercurio, o genes de

virulencia como el gen de la toxina exfoliativa B (Malachowa y Deleo, 2010). Todos los plásmidos contienen una región núcleo que es característica de cada tipo de plásmido y que incluye un grupo de genes implicados en su mantenimiento, replicación y propagación (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

Los plásmidos de *Staphylococcus* pueden dividirse en tres grupos: a) plásmidos pequeños (1-5-kb) multicopia que normalmente solo portan un gen de resistencia; b) plásmidos más grandes (15-30 kb) con menor número de copias, que suelen albergar varios genes de resistencia; y c) plásmidos conjugativos, que normalmente tienen un tamaño de 30-60 kb y suelen presentar un gran número de genes de resistencia, y que disponen de toda una maquinaria autónoma para moverse a otras bacterias, ya que tienen determinantes de transferencia (*tra*) con función conjugativa (Alibayov *et al.*, 2014; Malachowa y Deleo, 2010).

Los plásmidos pueden heredarse de forma vertical, pero también se transfieren horizontalmente. Los de menor tamaño son movilizables por conjugación exclusivamente en presencia de un plásmido conjugativo (Malachowa y Deleo, 2010).

Elementos transponibles

Tanto las secuencias de inserción (IS) como los transposones (Tn) están ampliamente distribuidos en el genoma de los estafilococos. Pueden encontrarse en una copia o en múltiples copias, y se localizan en el ADN cromosómico o en asociación con otros EGMs.

Las ISs son segmentos de ADN que solo portan la información genética necesaria para la transposición. Contienen un (en algunas ocasiones dos) gen codificante de una transposasa (*tnp*) y están flanqueadas por repeticiones invertidas (Partridge *et al.*, 2018). Las ISs están implicadas en inversiones, deleciones y reorganización del genoma bacteriano. Además, son capaces de inducir cambios en la expresión de genes bien por la inactivación debido a su inserción directa o afectando a la transcripción de genes cercanos. También pueden tener el efecto contrario, potenciando la expresión de un gen al formar un promotor híbrido con el promotor nativo del gen (Alibayov *et al.*, 2014).

Las ISs se presentan frecuentemente en parejas formando un transposón compuesto. Así, pueden movilizar el ADN que flanquean, que en muchas ocasiones se trata de genes de resistencia a antibióticos, como una unidad completa (Partridge *et al.*, 2018). Al igual que las ISs, los transposones tienen la capacidad de integrarse y escindir-se aleatoriamente en el genoma bacteriano, aunque algunos de ellos tienen tendencia a insertarse en sitios de reconocimiento específicos, como es el caso de los transposones Tn558 y Tn559 en el gen cromosómico *radC*.

Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan y se replican exclusivamente en células bacterianas y son considerados uno de los EGMs con más relevancia en la variabilidad genética del género *Staphylococcus*. Muchos bacteriófagos portan genes accesorios que codifican factores de virulencia importantes para la supervivencia de *S. aureus* y, además, tienen un papel muy importante en la transducción mediada por fagos de la transferencia de ADN extra-cromosómico, como plásmidos o islas de patogenicidad. Los bacteriófagos son especie-específicos ya que normalmente solo infectan una

especie bacteriana o, incluso, líneas genéticas específicas de una especie determinada (Ingmer *et al.*, 2019).

Los fagos se dividen en tres grupos: a) fagos líticos, lisan la bacteria una vez se han multiplicado; b) fagos atemperados, tienen la capacidad de lisar las bacterias igual que los fagos líticos, pero normalmente se quedan de manera latente en la bacteria sin destruirla, integrándose en el genoma bacteriano como profagos; c) fagos lisogénicos, infectan a la bacteria y utilizan su maquinaria para multiplicarse pero sin llegar a destruirla (Malachowa y Deleo, 2010).

Los fagos de *S. aureus* se han clasificado en siete grupos de integrasas (Sa1int a Sa7int) que están relacionados con el sitio de integración en el cromosoma y con el contenido en genes de virulencia. Los más importantes son: a) Sa1int, algunos de ellos portan genes codificantes de toxinas exfoliativas; b) Sa2int, que vehiculizan los genes codificantes de la LPV; c) Sa3int, estrechamente relacionados con los genes que componen el IEC; d) Sa5int, portan genes codificantes de leucocidinas y de la subunidad F de la LPV; y e) Sa7int, algunos de ellos portan el gen *sak* del IEC (Goerke *et al.*, 2009).

Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs) son fragmentos de ADN de 14-27 kb, que se integran en uno de los cinco sitios específicos de inserción en el cromosoma (*atts*), en el caso de *S. aureus*. Las SaPIs contienen genes núcleo altamente conservados, y la mayoría de ellas portan genes codificantes de enterotoxinas, toxina exfoliativa EtD o TSST-1. Las SaPIs pueden ser movilizadas después de la infección de ciertos bacteriófagos estafilocócicos o por la inducción de fagos endógenos. Además de en *S. aureus*, estas islas de patogenicidad también se detectan en otras especies de *Staphylococcus*, pero en mucha menor proporción (Novick y Ram, 2017).

Casetes cromosómicos estafilocócicos

Los casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC) son grandes fragmentos de ADN que siempre se insertan en el gen *orfX* que se encuentra de forma conservada en el cromosoma de este género. Pueden codificar genes de resistencia o de virulencia, siendo el más conocido el SCC*mec* portador de los genes de resistencia a metilina *mecA* o *mecC* (Malachowa y Deleo, 2010).

6. Técnicas de tipado de *Staphylococcus*

Se han desarrollado diferentes técnicas de tipado en *Staphylococcus* spp. que son de gran utilidad para evaluar la evolución de los patógenos, estudiar las relaciones genéticas, investigar las características específicas de las distintas líneas genéticas, así como para controlar la diseminación de estos microorganismos. Normalmente, para el tipado de las cepas de este género bacteriano se combinan varias técnicas.

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

Esta técnica fue desarrollada en 1996, y se basa en la amplificación y posterior secuenciación de la región polimórfica X del gen codificante de la proteína estafilocócica A (*spa*), específica de *S. aureus* (Frénay *et al.*, 1996). El número y variabilidad de las repeticiones obtenidas se contrastan con las ya establecidas en un servidor online (<https://spaserver.ridom.de>) y, de esta forma, se puede asignar un tipo *spa* a cada cepa. Actualmente, se encuentran descritos 19566 *spa*-tipos diferentes. Se ha comprobado que existe una buena correlación entre el tipo *spa* y la secuencia tipo obtenida por la técnica de MLST.

6.2. Tipado mediante MLST (*Multilocus Sequence Typing*)

La técnica de MLST se basa en la amplificación y secuenciación de fragmentos internos de siete genes constitutivos, distribuidos a lo largo del genoma bacteriano y que son esenciales para el funcionamiento del organismo (Enright *et al.*, 2000). En el MLST se asignan alelos para cada gen en función de la secuencia nucleotídica. Estos genes evolucionan lentamente por lo que una mutación puntual da lugar a un nuevo alelo (Lakhundi y Zhang, 2018). Según la combinación alélica de esos siete genes, se asigna el perfil alélico denominado secuencia tipo (ST). El algoritmo BURST (*Based Upon Related Sequence Types*) se utiliza para definir diferentes complejos clonales (CCs). De esta forma, las secuencias tipo se agrupan en el mismo complejo clonal si comparten al menos cinco de los siete alelos (Feil *et al.*, 2004).

Esta técnica se emplea, no solo en *S. aureus* y otras especies de estafilococos, sino también en otros géneros bacterianos como *Enterococcus*.

6.3. Tipado del locus *agr*

En *S. aureus*, el *Agr* (*accessory gene regulator*) es un sistema de *quorum sensing* o autoinducción que se basa en la producción de autoinductores en función de la densidad poblacional y que es capaz de regular, entre otras cosas, numerosos genes de virulencia (Chalabreysse *et al.*, 2005).

El sistema *agr* consiste en un operón cromosómico con dos promotores (P2 y P3) que genera dos transcritos primarios: RNAII y RNAIII. El transcrito RNAIII es un regulador post-transcripcional de numerosos factores de virulencia. El transcrito RNAII codifica cuatro proteínas: AgrB, AgrD, AgrC y AgrA. AgrB es una endopeptidasa con varias funciones, entre ellas la maduración y exportación del péptido autoinducido (AIP) a partir de AgrD, que es el precursor del AIP. Las proteínas AgrC y AgrA forman el sistema regulador de dos componentes para la transducción de la señal, que se activa cuando la concentración del AIP alcanza un umbral; la unión del AIP conduce a la fosforilación de AgrA por parte de AgrC. Así, AgrA fosforilada actúa como regulador aumentando la expresión de RNAII y RNAIII a través de su unión a los promotores P2 y P3, respectivamente (**Figura 8**) (Ukpanah y Upla, 2017).

Las cepas de *S. aureus* se pueden clasificar en función de la variante del locus *agr* que contenga en cuatro tipos diferentes: *agrI*, *agrII*, *agrIII*, y *agrIV* (Shopsin *et al.*, 2003). Se ha sugerido que existe una asociación entre el tipo de *agr* y diferentes líneas genéticas, enfermedades o la producción de toxinas (Hao *et al.*, 2012).

En la especie *S. pseudintermedius*, el tipo de *agr* se basa en la variabilidad del AIP, habiéndose descrito cuatro variantes: RIPTSTGFF (variante I), RIPISTGFF (variante II), KIPTSTGFF (variante III) y KYPTSTGFF (variante IV) (Bannoehr *et al.*, 2007).

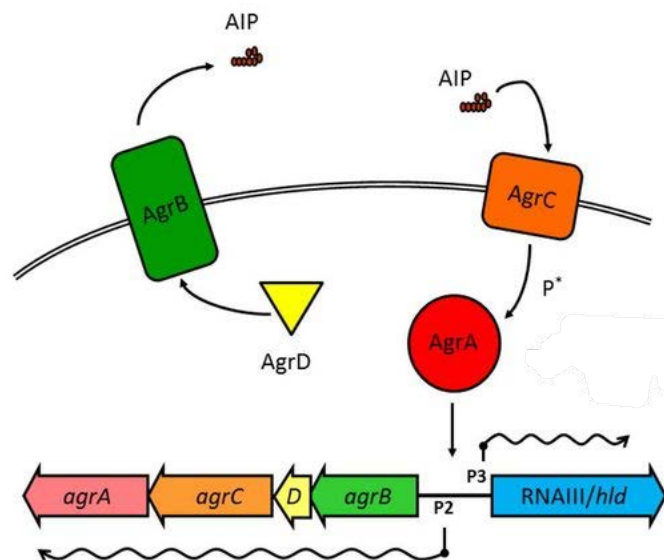


Figura 8. Organización y funcionamiento del locus *agr* en *S. aureus* (Ukpanah y Ulpa, 2017).

6.4. Electroforesis en campos pulsados (PFGE)

La técnica de PFGE se basa en la separación de fragmentos de macrorestricción obtenidos por la digestión del ADN genómico con una enzima de restricción de baja frecuencia de corte. De esta forma, los patrones obtenidos de las diferentes cepas pueden ser comparados para establecer relaciones genéticas entre ellas (Murchan *et al.*, 2003).

Es una técnica que tiene un gran poder discriminatorio, lo que la hace muy útil para el estudio de brotes hospitalarios. Además, la elaboración de un protocolo estandarizado denominado "Harmony PFGE protocol", permite la comparación de los resultados entre diferentes laboratorios (Murchan *et al.*, 2003). Para el tipado por PFGE en *S. aureus* se utiliza la enzima *SmaI*. Sin embargo, la línea genética ST398 no puede ser tipada usando esta enzima, debido a la metilación en las bases de adenina y citosina que impiden el corte por la enzima *SmaI* (Bens *et al.*, 2006). Por ello, varios autores han desarrollado adaptaciones utilizando otras enzimas como *Apal* o *Cfr9I* (Argudín *et al.*, 2010; Feßler *et al.*, 2012). Actualmente, aunque no existe un protocolo estandarizado para el tipado por PFGE de otras especies de estafilococos como *S. pseudintermedius*, en muchos estudios se ha adaptado el protocolo de *S. aureus* utilizando la enzima *SmaI* (Murchan *et al.*, 2003).

6.5. Tipado del SCCmec

La amplia distribución de los genes de resistencia a meticilina *mecC* y, especialmente, *mecA* se debe a que se encuentran localizados en el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) que tiene la capacidad de ser fácilmente transferido entre diferentes estafilococos (Figura 9) (Lee *et al.*, 2018). El SCC*mec* se ha convertido en un componente muy importante para el tipado de estafilococos resistentes a meticilina, especialmente en SARM.

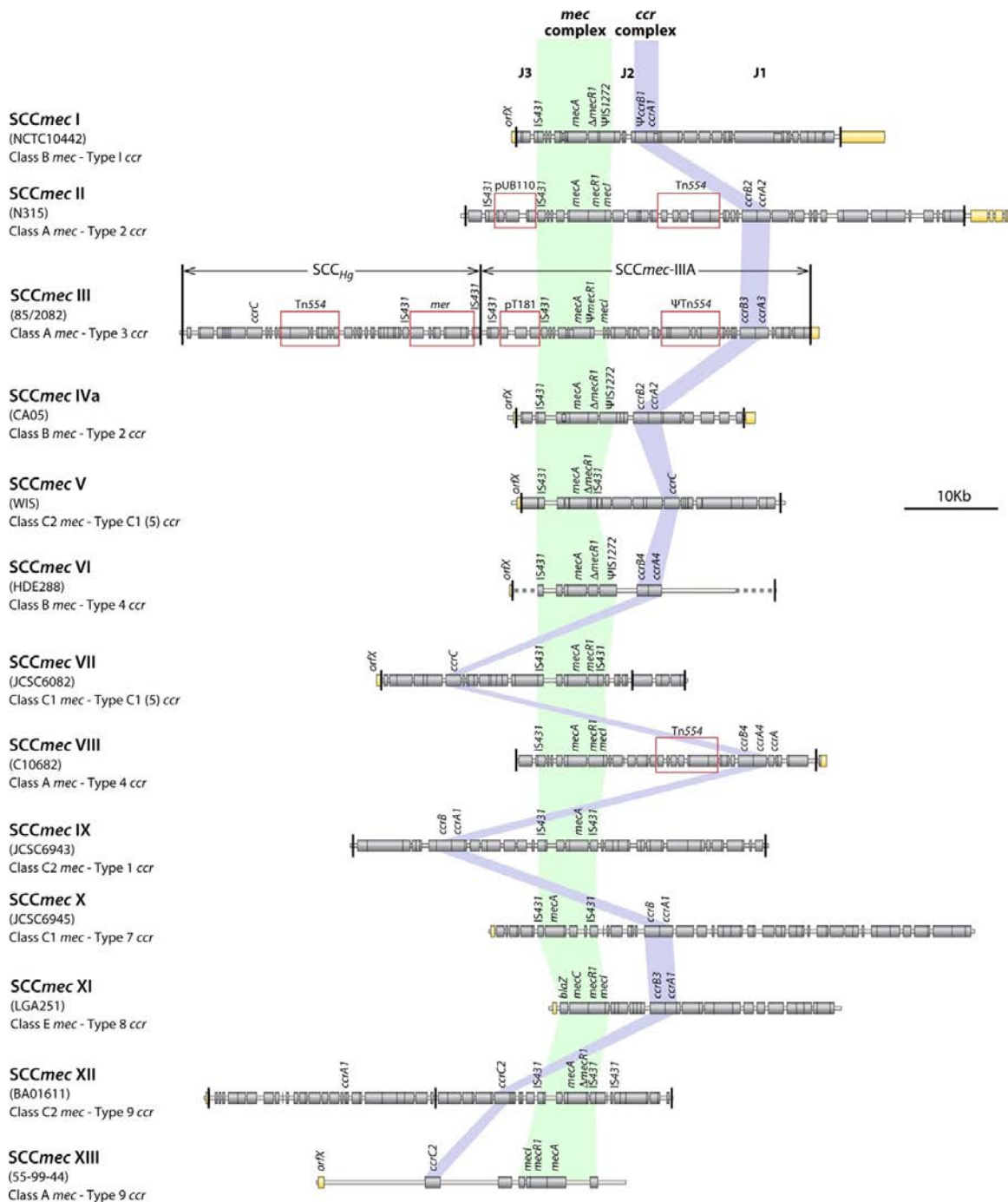


Figura 9. Estructura de los 13 tipos de SCC*mec* descrito hasta la fecha en SARM (Lakhundi y Zhang, 2018).

El complejo *mec* está sombreado en verde y el complejo *ccr* en azul. Los EGMs integrados en los SCC*mec* se muestran en rojo.

La gran variabilidad de organización estructural y de contenido genético del SCC*mec* ha resultado en su clasificación en diferentes tipos y subtipos. Hasta la fecha, en SARM se han descrito 13 tipos diferentes de SCC*mec* (**Figura 9**) (Lakhundi y Zhang, 2018). Dentro del SCC*mec* se reconocen tres estructuras básicas:

- El complejo *mec*, que contiene el gen *mec* correspondiente, los elementos reguladores que controlan su expresión (*mecR1* que codifica un regulador transcripcional y *mecI* que codifica una proteína represora de dicho gen) y las secuencias de inserción asociadas. En función de

las secuencias de inserción y de los elementos reguladores, se han descrito cinco clases diferentes de complejo *mec*, de la clase A a la E (**Tabla 6**) (Lakhundi y Zhang, 2018).

- El complejo *ccr*, que codifica recombinasas de sitio específico que actúan integrando o escindiendo el SCC*mec* en el cromosoma de *Staphylococcus*. En *S. aureus* se han identificado tres genes *ccr* diferentes (*ccrA*, *ccrB* y *ccrC*) y varios alotipos. En función de la combinación de los alotipos de *ccr*, existen nueve complejos *ccr* diferentes (**Tabla 6**) (Ito *et al.*, 2009; Lakhundi y Zhang, 2018).
- Secuencias adyacentes (regiones J), que no son componentes esenciales y pueden contener genes de resistencia a otros antibióticos (**Tabla 7**) (Lakhundi y Zhang, 2018).

Tabla 6. Tipos de SCC*mec* descritos en SARM.

| Tipo SCC <i>mec</i> | Complejo <i>ccr</i> | Estructura del complejo <i>ccr</i> | Complejo <i>mec</i> | Estructura del complejo <i>mec</i> |
|---------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|---|
| I | 1 | <i>ccrA1-ccrB1</i> | B | IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272 |
| II | 2 | <i>ccrA2-ccrB2</i> | A | IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i> |
| III | 3 | <i>ccrA-ccrB3</i> | A | IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i> |
| IV | 2 | <i>ccrA2-ccrB2</i> | B | IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272 |
| V | 5 | <i>ccrC</i> | C2 | IS431 ^a - <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^a |
| VI | 4 | <i>ccrA4-ccrB4</i> | B | IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272 |
| VII | 5 | <i>ccrC</i> | C1 | IS431 ^b - <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^b |
| VIII | 4 | <i>ccrA4-ccrB4</i> | A | IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i> |
| IX | 1 | <i>ccrA1-ccrB1</i> | C2 | IS431 ^a - <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^a |
| X | 7 | <i>ccrA1-ccrB6</i> | C1 | IS431 ^b - <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^b |
| XI | 8 | <i>ccrA1-ccrB3</i> | E | <i>blaZ-mecA</i> _{LGA251} - <i>mecR1</i> _{LGA251} - <i>mecI</i> _{LGA251} |
| XII | 9 | <i>ccrC2</i> | C2 | IS431 ^a - <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431 ^a |
| XIII | 9 | <i>ccrC2</i> | A | IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i> |

^aLas secuencias de inserción están en distinta orientación.

^bLas secuencias de inserción están en la misma orientación.

El SCC*mec* tipo XI es el único que se ha descrito portando el gen *mecC*, donde además se localiza el gen *blaZ*-SCC*mec*XI, un alelo del gen *blaZ* con el que comparte una identidad aminoacídica del 67% (Shore *et al.*, 2011a).

Tabla 7. Elementos genéticos móviles más importantes que han sido descritos dentro del SCC*mec* y genes de resistencia a antibióticos que portan.

| EGM | SCC <i>mec</i> | Genes de resistencia a antibióticos |
|--------|----------------|-------------------------------------|
| pUB110 | I, II, IVa | <i>ant(4')-Ia</i> |
| pT181 | III | <i>tet(K)</i> |
| Tn554 | III | <i>erm(A)</i> |
| Tn4001 | IV, XIII | <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> |

En SPRM se han descrito casetes compuestos y elementos pseudo-SCC*mec* que no contienen genes *ccr* (Chanchaithong *et al.*, 2016; Perreten *et al.*, 2013). En SCoN portadores de genes de resistencia a meticilina y, especialmente, en las cepas que no tienen un origen clínico, el tipado del SCC*mec* es más complejo. En SCoN hay múltiples variantes del SCC*mec* y SCC*mec* no tipables con los cebadores utilizados para *S. aureus*, por lo que este grupo está considerado como un reservorio de estructuras de SCC*mec* (Martínez-Meléndez *et al.*, 2015).

7. Epidemiología y líneas genéticas de *S. aureus*

Desde su aparición en la década de los 60, se ha demostrado que SARM tiene una gran capacidad de evolución y de establecer nuevos reservorios, aumentando así su diseminación. Las cepas SARM se pueden agrupar en base a diferentes características moleculares o en función del ambiente en el que se encuentren.

Actualmente, se pueden distinguir tres grandes grupos de SARM: SARM-AH (asociado al ámbito hospitalario), SARM-AC (asociado a la comunidad) y SARM-AG (asociado a ganado) (Bal *et al.*, 2016). Existe una cierta distribución geográfica de los principales clones de estos grupos, como aparece en la **Figura 10**.

En este apartado también se va a desarrollar las principales líneas genéticas encontradas en animales de compañía y en el medio natural.

7.1. *S. aureus* en humanos

7.1.1. SARM asociado al ámbito hospitalario (SARM-AH)

Desde la descripción de la primera cepa de SARM en 1961 en Inglaterra (Jevons, 1961), en las siguientes décadas SARM estaba considerado como un patógeno asociado principalmente al ámbito hospitalario, provocando numerosos brotes en diferentes países europeos como Dinamarca, Francia, y también en EE.UU (Lee *et al.*, 2018). En la década de los 80, SARM-AH ya suponía un serio problema de infecciones nosocomiales en todo el mundo.

Actualmente se ha determinado que existen solo unos pocos clones epidémicos causando enfermedades en todo el mundo (Aires-de-Sousa, 2017): ibérico (CC8/SCC*mec*I), húngaro (CC8/SCC*mec*II), brasileño (CC8/SCC*mec*III), de Nueva York/Japón (CC5/SCC*mec*II) y pediátrico (CC5/SCC*mec*IV). En Europa los clones predominantes de SARM-AH son CC5 y CC22, seguido de CC8 (**Figura 12**) (Aires-de-Sousa, 2017).

Según los datos publicados por el ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) (ECDC, 2019) sobre la prevalencia de SARM invasivo, se observa que en Europa existe un gradiente de norte a sur (**Figura 11**). En países del norte, como Islandia y Noruega, la incidencia es menor del 1%. En la mayoría de los países centroeuropeos se encuentran valores entre el 5 y el 25%, y en países del sur se estima un porcentaje de SARM entre el 25 y el 50% (**Figura 13**). Estas diferencias pueden ser debidas a las distintas políticas de uso de antibióticos.

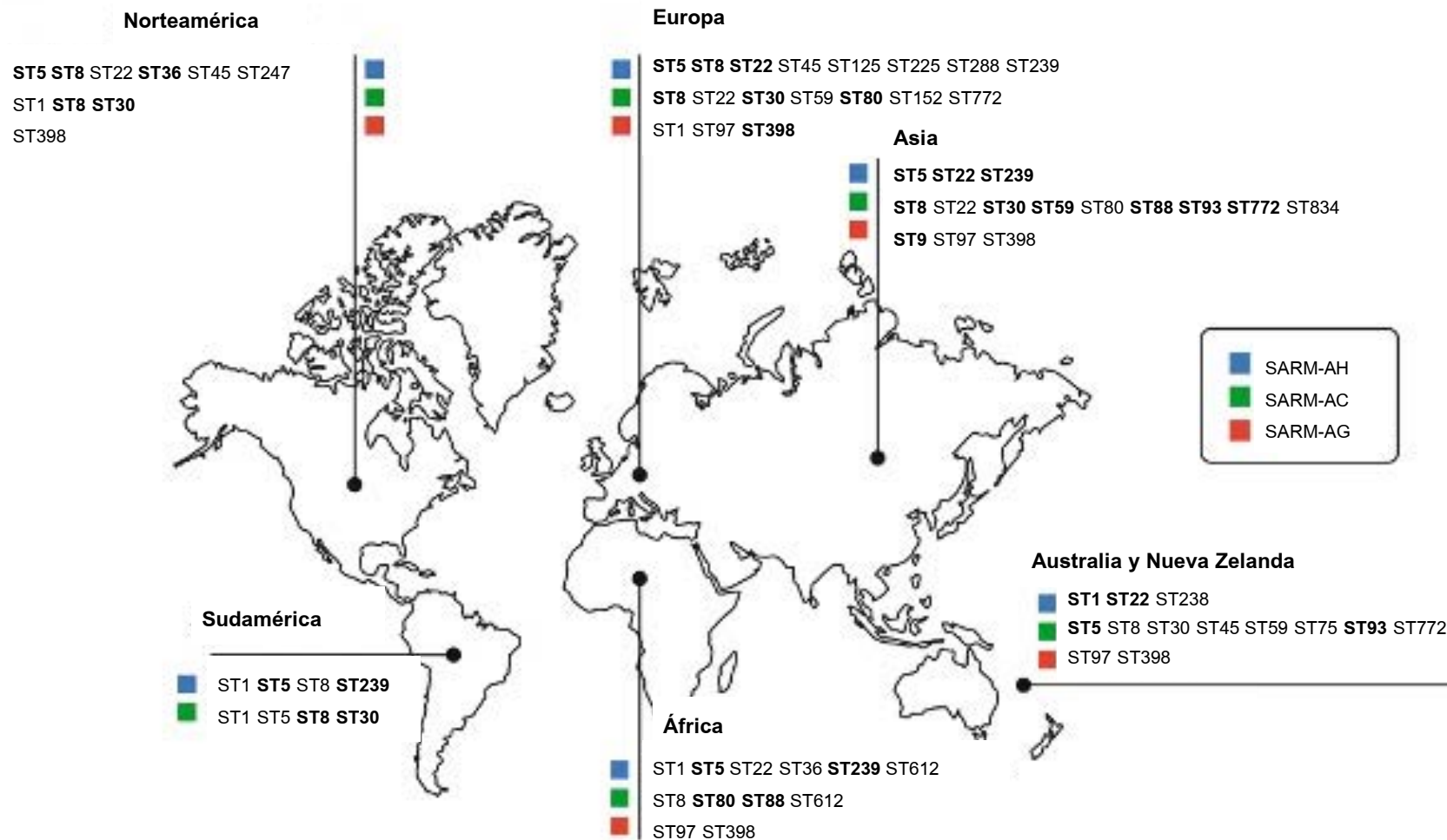


Figura 10. Distribución geográfica de los clones predominantes de SARM-AH, SARM-AC y SARM-AG (Aires-de-Sousa, 2017).

Los clones más comunes se muestran en negrita.

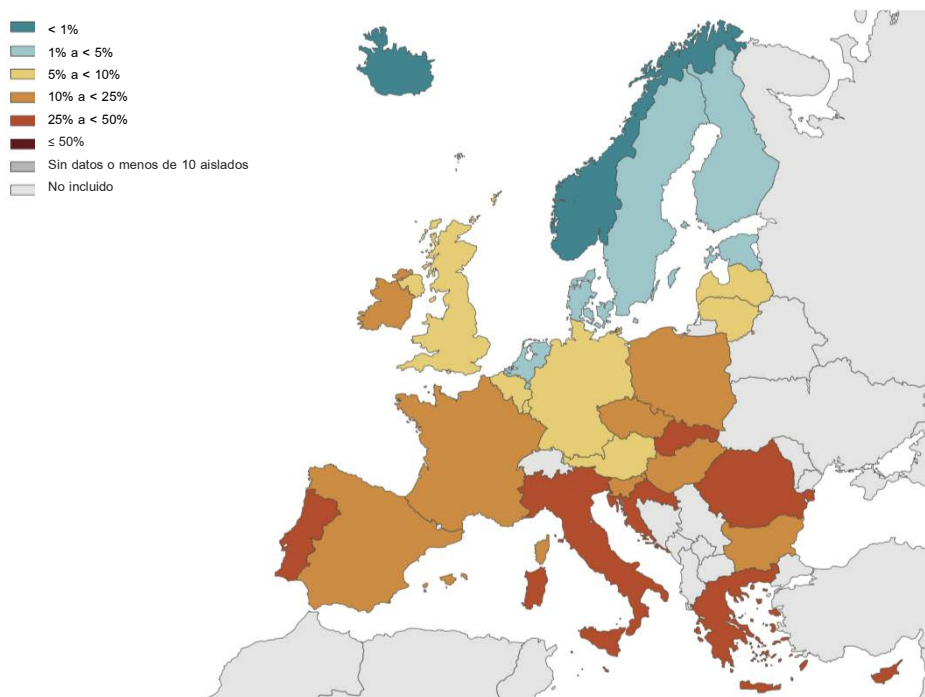


Figura 11. Porcentaje de aislados invasivos de SARM en Europa en el año 2018 (ECDC, 2019).

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

Aunque por un tiempo SARM fue considerado un patógeno asociado exclusivamente al ámbito hospitalario, durante la década de los noventa del siglo pasado se empezaron a reportar infecciones producidas por SARM en individuos sin contacto aparente con el sistema sanitario en diferentes países (Udo, 1993). Estas cepas pertenecían a líneas genéticas no relacionadas con SARM-AH y se denominaron SARM-AC.

Actualmente, las infecciones producidas por SARM-AC tienen un gran impacto clínico (Khan *et al.*, 2018). Además, los clones SARM-AC se han establecido en el ámbito hospitalario y, se ha sugerido, que pueden llegar a reemplazar a los clones SARM-AH. Aunque probablemente se trate de una explicación multifactorial, se han postulado diferentes teorías acerca de la rápida diseminación de los clones de SARM-AC. Una de ellas apunta a que las cepas SARM-AC poseen un incremento en la expresión de la toxina alfa y de modulinas solubles en fenol (PSMs, *Phenol-Soluble Modulins*), unos péptidos involucrados en el crecimiento y dispersión de estafilococos en las superficies epiteliales, lo que podría explicar parcialmente la rápida emergencia y diseminación de SARM-AC a nivel global (Cheung *et al.*, 2014).

Poco a poco se están empezando a desdibujar las diferencias fenotípicas entre SARM-AC y SARM-AH (Bal *et al.*, 2016), sin embargo, estos dos grupos se diferencian en sus características moleculares, las infecciones asociadas y los grupos de riesgo (**Tabla 8**) (Junie *et al.*, 2018).

Al igual que SARM-AH, la presencia de diferentes clones de SARM-AC tiene una distribución geográfica (**Figura 10**). Los clones de SARM-AC que están distribuidos globalmente son ST1-SCC*mecIV* (USA400), ST8-SCC*mecIV* (USA300), ST30-SCC*mecIV* (clon del suroeste del pacífico), ST59-SCC*mecV* (clon de Taiwán) y ST80-SCC*mecIV* (clon europeo), entre otros. El clon USA300 ha sido descrito frecuentemente en todo el mundo y puede considerarse pandémico (Aires-de-Sousa, 2017).

Tabla 8. Principales diferencias entre las cepas SARM-AH y SARM-AC (Junie *et al.*, 2018).

| | SARM-AH | SARM-AC |
|--------------------------------|---|---|
| SCCmec | I, II, III | IV, V |
| agr | I, II | I, III |
| Fenotipo de resistencia | Resistencia a múltiples familias de antibióticos | Normalmente sensibles a antibióticos no β -lactámicos |
| LPV | Ausente | Normalmente presente |
| infecciones asociadas | Neumonía, bacteriemia, infecciones invasivas... | Neumonía necrotizante, IPPB... |
| Grupos de riesgo | Ancianos, sanitarios, pacientes hospitalizados... | Niños, jóvenes, drogadictos, soldados... |

7.2. *S. aureus* en animales y en el medio natural

7.2.1. SARM asociado a ganado (SARM-AG)

En el año 2005 se acuñó el término de SARM-AG, antiguamente conocido como SARM-NT (no tipable), para una cepa aislada en los Países Bajos perteneciente al ST398 que no podía ser tipada mediante PFGE utilizando la enzima *Smal* (Voss *et al.*, 2005). Desde entonces, han emergido diferentes líneas genéticas de SARM en animales de producción como CC398, CC9, CC1 o CC97 (Bal *et al.*, 2016).

SARM CC398

S. aureus del complejo clonal CC398 es el linaje genético de SARM-AG prevalente en todo el mundo, pero especialmente en Europa y Norteamérica, aunque también se detecta ocasionalmente en Asia y África (Bal *et al.*, 2016; Butaye *et al.*, 2016). Está relacionado principalmente con la colonización en cerdos y otros animales de producción (Aires-de-Sousa, 2017; Gómez-Sanz *et al.*, 2010), pero cada vez se encuentra con más frecuencia en animales de compañía, fauna silvestre y humanos (Bal *et al.*, 2016; Ceballos *et al.*, 2019; Lozano *et al.*, 2012c; Mama *et al.*, 2019b; Ruiz-Ripa *et al.*, 2019; Wipf y Perreten, 2016), lo que pone de manifiesto su capacidad de colonizar diferentes hospedadores. El potencial zoonótico de SARM-CC398 ha sido confirmado en numerosas ocasiones, y el contacto con ganado es un factor de riesgo para la colonización e infección por SARM-CC398, siendo más frecuente en granjeros, veterinarios y trabajadores de mataderos, así como en personas que viven en áreas geográficas con una elevada densidad de ganado porcino (Ceballos *et al.*, 2019; Kittl *et al.*, 2020; Lozano *et al.*, 2012c). Sin embargo, en los últimos años han aparecido numerosos casos de colonización por SARM-CC398 en personas sin contacto aparente con animales de producción, lo que refuerza la teoría de su posible transmisión posterior de humano a humano (Lekkerkerk *et al.*, 2015). SARM-CC398 no está considerado un patógeno importante en animales, aunque se ha detectado ocasionalmente como agente causante de infecciones como mastitis (Silva *et al.*, 2014).

El análisis filogenético por secuenciación completa del genoma de cepas representativas de SARM-CC398 sugiere que este linaje desciende de un ancestro *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) de origen humano, y que se diseminó en el ganado donde adquirió el SCCmec y la resistencia a tetraciclina

y perdió los factores de adaptación al huésped específicos de humanos, como el sistema IEC. La posible readaptación de SARM-CC398 a humanos podría ocurrir por la adquisición de los genes del fago $\Phi 3$ que contiene genes del IEC, y podría ampliar su potencial como patógeno humano suponiendo un serio problema de salud pública (**Figura 12**) (Bal *et al.*, 2016; Pérez-Moreno *et al.*, 2017; Price *et al.*, 2012).

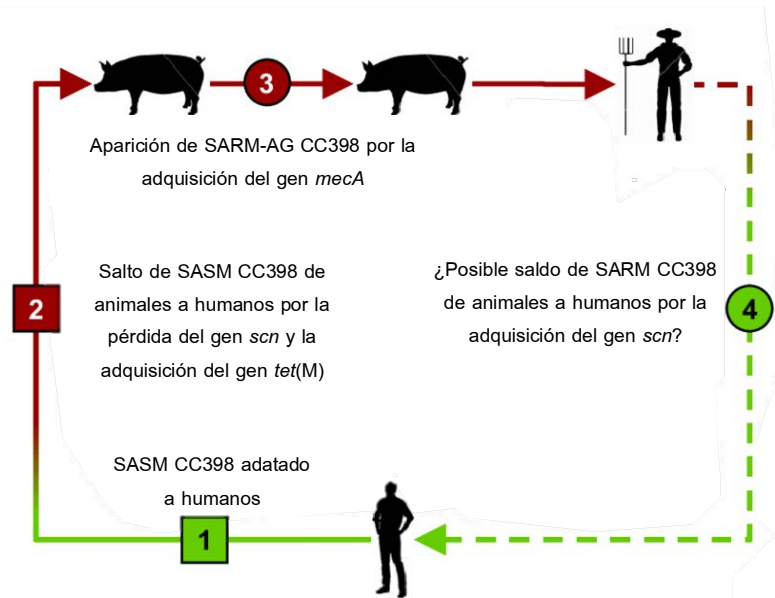


Figura 12. Origen y posible evolución de SARM-CC398 determinado mediante los análisis filogenéticos (Price *et al.*, 2012).

Existe una gran cantidad de *spa*-tipos asociados al CC398, siendo t011, t034 y t108 los más prevalentes (Price *et al.*, 2012). Este complejo clonal está relacionado principalmente con la secuencia tipo ST398, aunque también se han detectado otras como ST541, ST1965, ST1966, ST1967 y ST1968, todas ellas incluidas en el CC398. Aunque se han descrito diferentes tipos y variantes de *SCCmec* en este linaje, normalmente presentan los tipos IV o V (Butaye *et al.*, 2016; Price *et al.*, 2012).

El amplio uso de los antibióticos en el ámbito ganadero ha provocado que esta línea genética presente normalmente un fenotipo de multiresistencia (Butaye *et al.*, 2016; Kittl *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2014). Además, debido a que la tetraciclina es uno de los antibióticos más usados en el sector ganadero en Europa, la gran mayoría de las cepas SARM-CC398 presentan resistencia a este antibiótico mediada principalmente por la presencia del gen *tet(M)* (Kittl *et al.*, 2020; Price *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Por el contrario, las cepas de esta línea genética normalmente carecen de los factores de virulencia más importantes de *S. aureus* como la LPV, *tst*, toxinas exfoliativas y enterotoxinas (Argudín *et al.*, 2011; Ballhausen *et al.*, 2017; Price *et al.*, 2012).

SARM CC9

Aunque SARM-CC398 es la línea genética de SARM-AG más importante en todo el mundo, SARM CC9 es el linaje que se detecta con más frecuencia colonizando cerdos y granjeros en países asiáticos y, en menor medida, otros animales de producción como vacas y ovejas (Guo *et al.*, 2018). Esta línea genética también ha sido detectada ocasionalmente causando infecciones en humanos y animales (Köck *et al.*, 2013). La primera detección de SARM-CC9 en Europa data del año 2009 (Battisti *et al.*, 2010) y, desde entonces, se ha descrito en cepas procedentes de diferentes animales de producción y sus

productos derivados en diversos países europeos como Alemania, Reino Unido y Bélgica (Anjum *et al.*, 2019; Köck *et al.*, 2013; Peeters *et al.*, 2015). En el caso de España, SARM-CC9 ha sido descrito en cepas clínicas procedentes de un hospital ubicado en una zona con alta densidad de ganado porcino (Reynaga *et al.*, 2017), pero hasta la fecha no se ha detectado en ganado.

Cabe destacar que la variante sensible a meticilina del CC9 se ha descrito con cierta frecuencia en ganado en Europa (Benito *et al.*, 2014; Hasman *et al.*, 2010; Vandendriessche *et al.*, 2014), por lo que surgen dudas acerca de la evolución y epidemiología de esta línea genética. Las razones por las diferencias entre Europa y Asia son desconocidas, pero es probable que el SCC*mec* solo fuera adquirido por las cepas del continente asiático y no por las europeas (Butaye *et al.*, 2016).

Existe una gran diversidad en los *spa*-tipos asociados a este complejo clonal y, además, también parece tener una cierta distribución geográfica. El más prevalente es el t899, pero también lo son t4358 y t337 en el caso de los aislados asiáticos; en las cepas aisladas en países europeos se encuentra una mayor diversidad de *spa*-tipos, aunque los más frecuentes son t337, t526, t899, t1334, t1430, t1939 y t4794. Los SCC*mec* asociados varían (p. ej., III, IV y V) y muchos de ellos no son tipables (Butaye *et al.*, 2016).

Al igual que SARM-CC398, las cepas SARM del CC9 también suelen presentar un fenotipo de multiresistencia y resistencia a tetraciclina (Lo *et al.*, 2012), pero además suelen albergar genes de resistencia inusuales como *Inu*(B) y *cfr* (Chuang y Huang, 2015; Kehrenberg *et al.*, 2009). Respecto a los factores de virulencia, varios estudios en países asiáticos determinaron que más del 90% de los aislados del CC9 presentan algún gen codificante de enterotoxinas (Wan *et al.*, 2013). Además, también presentaban una frecuencia similar de detección del gen codificante de la TSST-1, aunque normalmente los resultados de producción de esta toxina son negativos (Chuang y Huang, 2015; Wan *et al.*, 2013). Otros factores de virulencia importantes como la LPV o toxinas exfoliativas también han sido detectados en cepas procedentes de cerdos (Butaye *et al.*, 2016; Wan *et al.*, 2013). Por todos estos datos parece que SARM-CC9 tiene un mayor potencial virulento que SARM-CC398.

Es importante destacar que existe un híbrido denominado SAMR-AG CC9/CC398, normalmente asociado al tipo *spa* t899, que consiste en el esqueleto de ADN cromosómico del linaje CC398 pero que contiene una pequeña región del CC9 que incluye la proteína *spa* (Larsen *et al.*, 2016). Este genotipo ha sido detectado en muestras clínicas, ganado y sus productos derivados en diversos países europeos, incluyendo España (Anjum *et al.*, 2019; Fetsch *et al.*, 2017; Larsen *et al.*, 2016). Diferentes estudios sugieren que las aves de corral pueden servir de vehículo de transmisión entre ganado y humanos de SARM CC9/CC398 a través de la cadena alimentaria (Anjum *et al.*, 2019; Fetsch *et al.*, 2017). Curiosamente, en este genotipo es común la presencia del fago Φ 3 que contiene los genes del IEC (Fetsch *et al.*, 2017; Larsen *et al.*, 2016a).

SARM CC130

Originalmente el linaje de CC130 se asociaba con cepas SASM de animales de producción, siendo un agente importante en infecciones en ovejas (Monecke *et al.*, 2016). Sin embargo, el complejo clonal CC130 ha adquirido mucha importancia en los últimos años debido a que es la principal línea genética portadora del gen de resistencia a meticilina *mecC*.

SARM CC130 *mecC* positivo se describió originalmente en cepas de origen animal y humano en Reino Unido y Dinamarca (García-Álvarez *et al.*, 2011). Posteriormente, este linaje ha sido detectado principalmente en animales en países europeos, incluyendo ganado, fauna silvestre y animales de compañía, por lo que se especula con un reservorio zoonótico (Aires-de-Sousa, 2017; Monecke *et al.*, 2016). Además, también se ha identificado SARM-*mecC* CC130 colonizando o provocando infecciones en humanos, principalmente infecciones de la piel o de heridas, exclusivamente en países europeos (Benito *et al.*, 2015; Lindgren *et al.*, 2016). Se ha determinado que uno de los factores de riesgo para la transmisión de esta línea genética es el contacto con animales, ya que se ha probado su transmisión entre animales y humanos de la misma granja (Paterson *et al.*, 2014)

Más de 30 STs han sido relacionados con el CC130, de los cuales la mayoría son variantes de un único alelo del ST130. Presentan características diferentes a otras líneas genéticas de SARM-AG, ya que normalmente son sensibles a la mayoría de antibióticos no β -lactámicos y portan genes codificantes de toxinas exfoliativas (Zarazaga *et al.*, 2018).

7.2.2. *S. aureus* en animales de compañía

S. aureus no es la especie estafilocócica predominante en la microbiota comensal de animales de compañía, sin embargo se encuentra en frecuencias relativamente altas (10%) colonizando la piel y membranas mucosas de perros y gatos (Ho *et al.*, 2012). Aunque las infecciones producidas por SARM en mascotas son todavía mucho más escasas que por SPRM, en los últimos años se ha observado un aumento de las mismas (Couto *et al.*, 2015; Petinaki y Spiliopoulou, 2015). En estos animales, *S. aureus* puede causar una amplia variedad de infecciones oportunistas pero las más comunes son IPPB, otitis e infecciones del tracto urinario (Haenni *et al.*, 2012).

La prevalencia de mascotas portadoras de SARM varía en función de los países y grupos de animales muestreados, pero se encuentran tasas de 0-4% en animales sanos mientras que la prevalencia varía entre el 2-20% en animales hospitalizados, o que han tenido algún tipo de enfermedad o tratamiento veterinario (Haenni *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2012; Kaspar *et al.*, 2018; Loeffler *et al.*, 2011; Weese y van Duijkeren, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Entre los factores de riesgo de infección por SARM en animales de compañía se incluyen el contacto con personas portadoras de SARM, el tratamiento previo con antibióticos, el tiempo que han permanecido en clínicas veterinarias y el uso de implantes quirúrgicos (Loeffler *et al.*, 2011; Soares Magalhães *et al.*, 2010).

Diversos estudios han demostrado que los perros y gatos son colonizados e infectados por los clones SARM-AH y SARM-AC más prevalentes entre la población de esa determinada región geográfica, sugiriendo un origen antropozoonótico (Couto *et al.*, 2015, 2011; Loeffler *et al.*, 2011; Petinaki y Spiliopoulou, 2015; Wipf y Perreten, 2016). Así, los clones aislados más frecuentemente de animales de compañía en Europa son CC22, CC30, CC5 y CC8 (Haenni *et al.*, 2012; Loeffler *et al.*, 2011; Loncaric *et al.*, 2019b), mientras que en China son ST59 y ST239 (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, en los últimos años está aumentando el número de descripciones de la línea genética SARM-AG CC398 entre animales de compañía en países europeos (Kaspar *et al.*, 2018; Loncaric *et al.*, 2019b). Las cepas SARM-AH y SARM-AC aisladas de estos animales no han sufrido importantes cambios genéticos adaptativos y, normalmente, estas cepas siguen portando factores de virulencia asociados a cepas

humanas como la LPV y los genes que componen el IEC (Couto *et al.*, 2015; Haenni *et al.*, 2012; Loncaric *et al.*, 2019b; Wannet *et al.*, 2005). Respecto a las cepas SASM, aunque los datos disponibles son muy escasos, sugieren que siguen la misma epidemiología que los aislados SARM.

La colonización de animales de compañía por SARM conlleva un gran impacto para la salud humana, ya que se ha probado en numerosas ocasiones el intercambio de patógenos entre humanos y animales y viceversa, al encontrarse patrones indistinguibles de PFGE entre las cepas de mascotas y sus dueños (Ferreira *et al.*, 2011; Manian, 2003; Van Duijkeren *et al.*, 2004; Wannet *et al.*, 2005). Además un estudio en EEUU identificó a los animales de compañía como la fuente probable de infección por SARM en humanos (Manian, 2003).

7.2.3. *S. aureus* en el medio natural

S. aureus tiene capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, y además de encontrarse en animales y humanos, se ha detectado en distintos compartimentos ambientales, como aire y aguas superficiales. Sin embargo, existen pocos estudios que caractericen las cepas *S. aureus* de origen ambiental. En muestras de aguas superficiales se ha encontrado *S. aureus* con bajas tasas de resistencia a antibióticos, pero también SARM portadores de los genes *mecA* y *mecC*. Se ha detectado una gran diversidad de complejos clonales, principalmente SASM, incluyendo CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, CC130, CC133 y CC425 (Gómez *et al.*, 2017; Heaton *et al.*, 2020). En el caso del aire, diferentes estudios han investigado la presencia de *S. aureus*, y especialmente de SARM-AG en el aire y suelo de granjas porcinas. La mayoría de los estudios han referido una baja presencia de SARM-AG en muestras de aire, pero su presencia puede contribuir a la diseminación de estas líneas genéticas en el medio ambiente (Heaton *et al.*, 2020).

En relación con la fauna silvestre, *S. aureus* se aísla formando parte de la microbiota normal y como agente causante de infección. En el caso concreto de España, la prevalencia de SARM colonizando fauna silvestre es menor del 5%, mientras que la de SASM está entre el 5-25% (Porrero *et al.*, 2014, 2013). Por otro lado, se ha descrito una gran diversidad de líneas genéticas de *S. aureus* en este ecosistema, aunque las detectadas con mayor frecuencia incluyen una combinación de clones pandémicos humanos (ST5, ST8, ST1, ST30, ST22), y de clones que se detectan con mayor frecuencia en animales o que se encuentran en la interfaz-animal hombre (ST398, ST130, ST133, ST425) (Heaton *et al.*, 2020). Sin embargo, está siendo especialmente prevalente el aislamiento de SARM-*mecC* CC130 en España y en diferentes países europeos (Gómez *et al.*, 2014; Monecke *et al.*, 2016; Moreno-Grúa *et al.*, 2020; Ruiz-Ripa *et al.*, 2019).

8. El género *Enterococcus*

Los enterococos son cocos Gram-positivos y anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterococcaceae*. Actualmente, el género *Enterococcus* está compuesto por 59 especies. Los enterococos son comensales del tracto gastrointestinal de humanos y de una gran variedad de animales, pero también se encuentran con frecuencia en el medio ambiente y en alimentos. Además, son importantes patógenos oportunistas, habiéndose convertido en una de las principales causas de

infecciones nosocomiales e infecciones asociadas a la comunidad, incluyendo infecciones del tracto urinario, endocarditis y septicemia. *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies más importantes a nivel clínico, así como también las especies predominantes en el intestino de humanos y animales, incluyendo animales de producción (Torres *et al.*, 2018).

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a diversos antibióticos incluyendo cefalosporinas, sulfonamidas, clindamicina y resistencia de bajo nivel a aminoglucósidos. Además, tienen una gran capacidad para adquirir genes de resistencia a otros antibióticos a través de EGMs, lo que limita las opciones terapéuticas. Los mecanismos de resistencia a antibióticos adquiridos en *Enterococcus* spp. son muy similares a los que encontramos en *Staphylococcus* spp. (Torres *et al.*, 2018) (Tabla 9).

Tabla 9. Mecanismos de resistencia a antibióticos más frecuentes en el género *Enterococcus* (Torres *et al.*, 2018).

| Familia | Antibióticos | Mecanismo de resistencia en <i>Enterococcus</i> spp. | Mecanismo de resistencia |
|--|----------------------------|--|--------------------------|
| β -lactámicos | Penicilina | Cambios aminoacídicos en la PBP5 | Modificación de la diana |
| | Ampicilina | | |
| Glucopéptidos | Vancomicina | <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanD</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i> , <i>vanL</i> , <i>vanM</i> , <i>vanN</i> | Modificación de la diana |
| | Teicoplanina | | |
| Aminoglucósidos | Gentamicina | <i>aac(6')</i> -Ie- <i>aph(2'')</i> -Ia, <i>aph(3')</i> -III, <i>ant(6')</i> -Ia | Inactivación enzimática |
| | Kanamicina | | |
| | Amikacina | | |
| | Estreptomina | | |
| Macrólidos- Lincosamidas- Estreptograminas | Eritromicina | <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>vga(C)</i> , <i>vga(E)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(C)</i> , <i>lsa(E)</i> | Modificación de la diana |
| | Clindamicina | | Inactivación enzimática |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> | Expulsión activa |
| | | | Protección de la diana |
| Fenicoles | Cloranfenicol | CAT, <i>fexA</i> , <i>fexB</i> | Inactivación enzimática |
| | Florfenicol | | Expulsión activa |
| Trimetoprim | Trimetoprim-sulfametoxazol | <i>dfpA</i> , <i>dfpD</i> , <i>dfpG</i> , <i>dfpK</i> | Cambio de diana |
| Quinolonas | Ciprofloxacino | Cambios aminoacídicos en GyrA y ParC | Mutación en la diana |
| | Levofloxacino | | |
| Oxazolidinonas | Linezolid Tedizolid | Mutaciones en el ARNr 23S y cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22 | Modificación de la diana |
| | | <i>ctr</i> , <i>optrA</i> , <i>poxtA</i> | Modificación de la diana |
| | | | Protección de la diana |

Objetivos

Objectives



1. Determinar la prevalencia, diversidad de especies, mecanismos de resistencia a antibióticos y líneas genéticas asociadas de *Staphylococcus* spp. procedentes de:
 - a. Aves silvestres
 - b. Muestras ambientales de granjas porcinas con distintos sistemas de producción
 - c. Animales de producción y animales de compañía con signos de infección.
2. Analizar los mecanismos de resistencia a linezolid en aislados de *Staphylococcus* spp. de los diferentes orígenes, así como determinar el entorno genético de los genes de resistencia implicados. Realizar un estudio comparativo con los mecanismos de resistencia a linezolid en cepas clínicas de *Staphylococcus* spp. y en cepas de diverso origen de *Enterococcus* spp.
3. Estudiar la presencia de genes codificantes de factores de virulencia de interés en las cepas de *Staphylococcus* spp. de los diferentes orígenes.

1. To determine the prevalence, diversity of species, mechanisms of antimicrobial resistance and the associated genetic lineages among *Staphylococcus* spp. recovered from:
 - a. Free-living birds.
 - b. Environment of swine farms with different productive design.
 - c. Livestock and companion animals with signs of infection.
2. To analyze the mechanisms of linezolid resistance among the *Staphylococcus* spp. isolates of the diverse origins, as well as to determine the genetic environment of the genes implicated. To perform a comparative study with mechanisms detected among clinical *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. of diverse origins.
3. To study the presence of genes encoding virulence factors of interest among the *Staphylococcus* spp. isolates of the diverse origins.

Material y métodos



1. Cepas estudiadas

1.1. *Staphylococcus* spp. de muestras traqueales de aves silvestres

Se obtuvieron 242 muestras traqueales de aves silvestres en diferentes regiones de España. Dichas muestras fueron recogidas por el grupo de investigación de la Dra. Úrsula Hoffle (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, CISIC-UCLM, Ciudad Real), mediante el uso de torundas de algodón estériles con medio de conservación Amies (Deltalab), las cuales fueron refrigeradas inmediatamente (4-10 °C) y congeladas a -80 °C en un máximo de 8 horas desde su toma. Las torundas con las muestras recogidas fueron remitidas a la Universidad de la Rioja, en estado de congelación, para su procesamiento en esta tesis. Ninguno de los animales muestreados fue capturado específicamente para este estudio. En todos los casos, la captura y manejo de las aves fueron autorizados por las autoridades locales, los manejos fueron realizados por personal acreditado y los métodos de muestreo siguieron las guías éticas nacionales e internacionales (RD1201/2005, RD53/2013 y CE2010/63/EU).

Las especies y número de animales muestreados fueron los siguientes (**Figura 13**): buitre negro (*Aegypius monachus*), 98; urraca (*Pica pica*), 59; milano real (*Milvus milvus*), 38; ibis eremita (*Geronticus eremita*), 27; quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*), 9; gaviota reidora (*Chroicocephalus ridibundus*), 6; alimoche (*Neophron percnopterus*), 2; abejero europeo (*Pernis apivorus*), 2; aguilucho lagunero (*Circus aeruginosus*), 1.

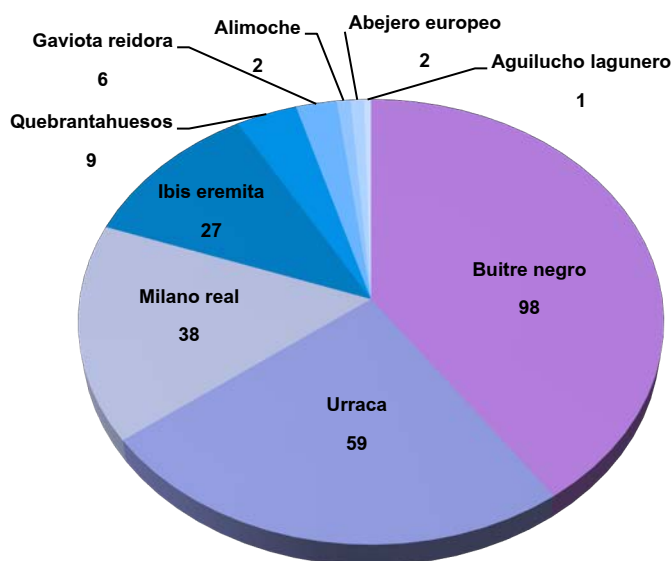


Figura 13. Número de aves muestreadas de cada especie.

En la **Figura 14** se resume la distribución geográfica y temporal de la toma de muestras. Las muestras fueron recogidas en provincias del norte (Huesca), sur (Cádiz) y centro (Ciudad, Real, Madrid, Valencia y Castellón) de España. Para la mayoría de las especies (gaviota reidora, urraca, buitre negro, ibis eremita, alimoche, y abejero europeo), el muestreo tuvo lugar durante el periodo de cría (entre los meses de mayo y agosto). Tanto los milanos como el aguilucho lagunero fueron muestreados en invierno durante los meses de noviembre, enero y febrero. Los polluelos de quebrantahuesos fueron

muestreados justo antes de verano (mayo y junio) y los adultos al final de otoño (noviembre). Todos los datos relativos a la toma de muestras y a las características de las aves se muestran en el **Anexo I**.

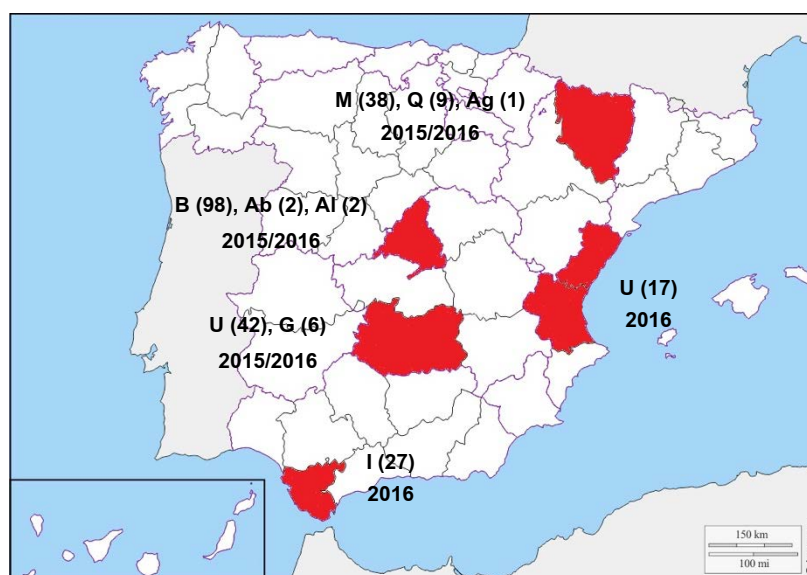


Figura 14. Distribución geográfica y temporal de la toma de muestras de aves silvestres.

Entre paréntesis aparece el número de aves muestreadas.

Ab, abejero europeo; Ag, aguilucho lagunero; Al, alimoche; B, buitres negro; G, gaviota reidora; I, ibis eremita; M, milano; Q, quebrantahuesos; U, urraca.

Las muestras traqueales fueron inoculadas en medio BHI (*Brain Heart Infusion*; Condalab) caldo suplementado con NaCl al 6,5% y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se sembraron 30 µL del cultivo en MSA (*Manitol Salt Agar*; Condalab) y medio ORSAB (*Oxacillin Resistance Screening Agar Base*; Oxoid™) suplementado con 2 µg/L de oxacilina para el aislamiento de *Staphylococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina, respectivamente. Se seleccionaron un máximo de siete colonias por placa con morfología compatible con estafilococos para su posterior identificación.

1.2. *Staphylococcus* spp. de muestras ambientales de granjas porcinas

Se analizaron 72 cepas *Staphylococcus* spp. aisladas de muestras ambientales de dos granjas porcinas con diferente sistema de producción situadas en La Rioja, obtenidas previamente (Sanz *et al.*, 2018). La granja PI es una granja de producción intensiva que cuenta con 7300 cerdos, mientras que la granja PSE es una granja de producción semi-extensiva, en la cual se alimentan a 2000 cerdos en 17 hectáreas de encinar. Las cepas procedían de muestras tomadas de aire dentro de las granjas y del tanque de purines.

1.3. *S. aureus* de animales de producción con signos de infección

Se analizó una colección de 23 cepas de *S. aureus* obtenidas de 23 cerdos con signos aparentes de infección, procedentes de 20 granjas localizadas en diferentes puntos de España, durante el periodo de septiembre de 2018 a octubre de 2019. Dichas cepas fueron aportadas por las Dras. Anna Vilaró (Grup de Sanejament Porcí de LLeida) y Alba Bellés-Bellés (Hospital Arnau de Vilanova de Lleida) y correspondían a líquido sinovial (n=10), muestras de piel (n=8) y muestras de necropsias (n=5).

Aunque las muestras se tomaron de los sitios de infección y, probablemente estén implicados en el proceso infeccioso, no se puede descartar de que se trate de bacterias colonizadoras, especialmente en las muestras de necropsia, ya que dichas muestras fueron tomadas en las granjas donde las condiciones de esterilidad no están garantizadas.

1.4. SCoP de animales de compañía con signos de infección

Se estudiaron un total de 33 cepas SCoP obtenidas de 28 perros y cinco gatos enfermos, aisladas en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza durante 2009 (9 cepas), 2010 (15) y 2011 (9). Dichas cepas fueron aportadas gracias a la colaboración con la Profesora Carmen Simón, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Las muestras fueron tomadas del sitio de infección y se incluyó una cepa por animal (**Anexo III**).

1.5. *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. resistentes a linezolid de origen clínico

Durante los años 2017 y 2018 los aislados clínicos de *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. que presentaron resistencia a linezolid (concentración mínima inhibitoria ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ para enterococos y >4 $\mu\text{g/mL}$ para estafilococos) de siete hospitales españoles localizados en diferentes regiones fueron remitidos a la Universidad de La Rioja para el estudio de los mecanismos de resistencia a linezolid. Los hospitales que participaron fueron el Hospital San Pedro (Logroño), Hospital Royo Villanova (Zaragoza), Hospital Universitario Lozano-Blesa (Zaragoza), Hospital San Jorge (Huesca), Hospital Verge de la Cinta (Tortosa), Hospital Arnau de Vilanova (Lleida) y Hospital Universitario de Getafe (Getafe) (**Figura 15**).



Figura 15. Localización de los siete hospitales españoles donde se aislaron las cepas *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. resistentes a linezolid.

HSJ, Hospital San Jorge; HUG, Hospital Universitario de Getafe; HSP, Hospital San Pedro; HVC, Hospital Verge de la Cinta; HLB, Hospital Lozano Blesa; HRV, Hospital Royo Villanova; HAV, Hospital Arnau de Vilanova.

En total se estudiaron 18 cepas de estafilococos resistentes a linezolid (LZD^R) que pertenecían a las especies *S. epidermidis* (n=14), *S. aureus* (n=3) y *S. hominis* (n=1). Fueron aisladas de muestras de

sangre (n=7), nasales/faríngeas (n=4), catéter venoso (n=2), esputo (n=1), piel (n=1), catéter de diálisis (n=1), exudado (n=1) y orina (n=1). Todas las cepas se aislaron de diferentes pacientes excepto *S. epidermidis* C10040, *S. epidermidis* C10515, y *S. hominis* X315, que pertenecían al mismo paciente.

Los enterococos LZD^R pertenecían a las especies *E. faecalis* (n=13) y *E. faecium* (n=6) y fueron aislados de diferentes pacientes de muestras de orina (n=9), exudado (n=2), úlcera (n=2), absceso (n=2), sangre (n=2) y herida quirúrgica (n=2).

2. Determinación de la sensibilidad a antibióticos

El fenotipo de resistencia a antibióticos de las cepas de origen clínico y de las cepas de animales de producción con signos de infección fue determinado por los respectivos hospitales utilizando la técnica MicroScan[®] (Beckman Coulter) y se interpretaron según los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2019) o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (EUCAST, 2019), dependiendo del hospital. Los antibióticos que se analizaron fueron los siguientes: penicilina, ampicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, quinupristin-dalfopristin, gentamicina, tobramicina, amikacina, tetraciclina, ciprofloxacino, levofloxacino, linezolid, vancomicina, teicoplanina, daptomicina, mupirocina, fosfomicina, ácido fusídico y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, la CMI a linezolid y tedizolid se determinó mediante E-test[®] (bioMérieux) (CLSI, 2019).

En las cepas aisladas de las muestras de aves, de muestras ambientales de granjas porcinas y de procesos infecciosos de animales de compañía se estudió la sensibilidad a antibióticos por el método de difusión en disco y por la técnica de microdilución.

Se consideraron cepas multiresistentes las que presentaron resistencia al menos a tres familias diferentes de antibióticos, sin incluir las resistencias intrínsecas.

2.1. Método de difusión en disco

El método de difusión en disco se utilizó para estudiar la sensibilidad a los siguientes antibióticos: penicilina, ampicilina, oxacilina, cefoxitina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina, estreptomina, tetraciclina, ciprofloxacino, cloranfenicol, linezolid, ácido fusídico y trimetoprim-sulfametoxazol.

Partiendo de un cultivo bacteriano puro crecido durante 24 horas en BHI agar, se realizó una suspensión bacteriana con una concentración de 0,5 McFarland en solución salina. Con un hisopo estéril se extendió la suspensión bacteriana sobre placas de MH (*Müller-Hinton*; Condalab) agar y se colocaron los discos de antibiótico (Oxoid[™]). Tras una incubación de 24 horas a 37 °C, se midió el halo de inhibición de los diferentes antibióticos.

La detección del fenotipo MLS_B inducible se realizó mediante la prueba del doble disco (D-test) (CLSI, 2019) colocando los discos de eritromicina y clindamicina a una distancia de 15-20 mm. Si la cepa presentaba el fenotipo MLS_B inducible aparecía un achatamiento del halo de inhibición de la clindamicina.

La interpretación de los resultados se realizó siguiendo los criterios del CLSI (CLSI, 2019) y, para aquellos antibióticos no considerados en el CLSI, se utilizaron las recomendaciones establecidas por el EUCAST (EUCAST, 2019) y CA-SFM (*Comité de l'Antibiogramme Société Française de Microbiologie*) (CA-SFM, 2013) (Tabla 10 y Tabla 11).

Tabla 10. Discos de antibióticos empleados y diámetro del halo de inhibición establecidos para *Staphylococcus* spp.

| Antibiótico | Abreviatura | Carga (µg) | Halo de inhibición (mm) | | | Referencia |
|---|-------------|-------------|-------------------------|-------|-----|--------------|
| | | | S | I | R | |
| Penicilina | PEN | 10 unidades | ≥29 | - | ≤28 | CLSI, 2019 |
| Oxacilina <i>S. pseudintermedius</i> | OXA | 1 | ≥18 | - | ≤17 | CLSI, 2019 |
| Cefoxitina <i>S. aureus</i> | FOX | 30 | ≥22 | - | ≤21 | CLSI, 2019 |
| Cefoxitina SCoN | FOX | 30 | ≥25 | - | ≤24 | CLSI, 2019 |
| Eritromicina | ERI | 15 | ≥23 | 14-22 | ≤13 | CLSI, 2019 |
| Clindamicina | CLI | 2 | ≥21 | 15-20 | ≤14 | CLSI, 2019 |
| Gentamicina | GEN | 10 | ≥15 | 13-14 | ≤12 | CLSI, 2019 |
| Tobramicina | TOB | 10 | ≥15 | 13-14 | ≤12 | CLSI, 2017 |
| Kanamicina | KAN | 30 | ≥18 | 14-17 | ≤13 | CLSI, 2017 |
| Amikacina | AMK | 30 | ≥17 | 15-16 | ≤14 | CLSI, 2017 |
| Estreptomina | STR | 10 | ≥15 | 13-14 | <13 | CA-SFM, 2013 |
| Tetraciclina | TET | 30 | ≥19 | 15-18 | ≤14 | CLSI, 2019 |
| Ciprofloxacino | CIP | 5 | ≥21 | 16-20 | ≤15 | CLSI, 2019 |
| Cloranfenicol | CLO | 30 | ≥18 | 13-17 | ≤12 | CLSI, 2019 |
| Linezolid | LZD | 30 | ≥21 | - | ≤20 | CLSI, 2019 |
| Ácido fusídico | FUS | 10 | ≥24 | - | <24 | EUCAST, 2019 |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | SXT | 1.25-23.75 | ≥16 | 11-15 | ≤10 | CLSI, 2019 |

Tabla 11. Discos de antibióticos empleados y diámetro del halo de inhibición establecidos para *Enterococcus* spp.

| Antibiótico | Abreviatura | Carga (µg) | Halo de inhibición (mm) | | | Referencia |
|--------------|-------------|-------------|-------------------------|-------|-----|------------|
| | | | S | I | R | |
| Penicilina | PEN | 10 unidades | ≥15 | - | ≤14 | CLSI, 2019 |
| Ampicilina | AMP | 10 | ≥17 | - | ≤16 | CLSI, 2019 |
| Eritromicina | ERI | 15 | ≥23 | 14-22 | ≤13 | CLSI, 2019 |
| Gentamicina | GEN | 120 | ≥10 | 7-9 | 6 | CLSI, 2015 |

| Antibiótico | Abreviatura | Carga (μg) | Halo de inhibición (mm) | | | Referencia |
|----------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------|-----------|------------|
| | | | S | I | R | |
| Estreptomina | STR | 300 | ≥ 10 | 7-9 | 6 | CLSI, 2015 |
| Tetraciclina | TET | 30 | ≥ 19 | 15-18 | ≤ 14 | CLSI, 2019 |
| Ciprofloxacino | CIP | 5 | ≥ 21 | 16-20 | ≤ 15 | CLSI, 2019 |
| Cloranfenicol | CLO | 30 | ≥ 18 | 13-17 | ≤ 12 | CLSI, 2019 |
| Linezolid | LZD | 30 | ≥ 23 | 21-22 | ≤ 20 | CLSI, 2019 |

2.2. Método de microdilución

Se utilizó esta técnica para estudiar los cambios en la sensibilidad a antibióticos en las cepas transconjugantes con respecto a la cepa receptora. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada antibiótico se determinó por microdilución en placas de 96 pocillos siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2019). Los antibióticos testados fueron eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid.

Se partió de los antibióticos en polvo de los que se preparó una disolución de trabajo a una concentración de 5 mg/mL en el disolvente adecuado según el compuesto (CLSI, 2019) (Tabla 12 y Tabla 13). A partir de esta, se preparó la disolución de trabajo al doble de la concentración máxima deseada en placa en medio CAMHB (*Cation Adjusted Mueller Hinton Broth*; Difco®) y se realizaron diluciones seriadas del antibiótico en medio CAMHB. Se preparó la suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland y se hizo una dilución 1:100 en medio CAMHB que se añade en la placa en el mismo volumen que el antibiótico, para así tener una concentración final de bacteria de 5×10^5 UFC/mL en cada pocillo. Se reservan dos pocillos para realizar controles, tanto del crecimiento bacteriano como de la turbidez del antibiótico. Se utilizaron las cepas *E. faecalis* ATCC® 29212 y *S. aureus* ATCC® 29213 como controles. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37° C y los resultados se interpretaron según los criterios del CLSI (CLSI, 2019) (Tabla 12 y Tabla 13).

Tabla 12. Antibióticos utilizados para la técnica de microdilución y puntos de corte establecidos para *Staphylococcus* spp.

| Antibiótico | Abreviatura | Disolvente | CMI ($\mu\text{g/mL}$) | | | Referencia |
|---------------|-------------|------------|--------------------------|-----|-----------|------------|
| | | | S | I | R | |
| Clindamicina | CLI | Agua | ≤ 0.5 | 1-2 | ≥ 4 | CLSI, 2019 |
| Cloranfenicol | CLO | Etanol 95% | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | CLSI, 2019 |
| Florfenicol | FFN | Etanol 95% | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | CLSI, 2019 |
| Linezolid | LZD | Agua | ≤ 4 | | ≥ 8 | CLSI, 2019 |

Tabla 13. Antibióticos utilizados para la técnica de microdilución y puntos de corte establecidos para *Enterococcus* spp.

| Antibiótico | Abreviatura | Disolvente | CMI ($\mu\text{g/mL}$) | | | Referencia |
|---------------|-------------|------------|--------------------------|-----|-----------|------------|
| | | | S | I | R | |
| Eritromicina | ERI | Etanol 95% | ≤ 0.5 | 1-4 | ≥ 8 | CLSI, 2019 |
| Clindamicina | CLI | Agua | - | - | - | - |
| Tetraciclina | TET | Agua | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 | CLSI, 2019 |
| Cloranfenicol | CLO | Etanol 95% | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | CLSI, 2019 |
| Florfenicol | FFN | Etanol 95% | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 | CLSI, 2019 |
| Linezolid | LZD | Agua | ≤ 2 | 4 | ≥ 8 | CLSI, 2019 |

3. Extracción de ADN

3.1. Extracción de ADN genómico

Staphylococcus spp.

Para la extracción del ADN de las cepas de *Staphylococcus* spp. se utilizó la técnica de la lisostafina y la proteinasa K que se detalla a continuación:

1. Se sembraron las cepas en BHI agar y se incubaron durante 24 horas a 37 °C.
2. Se suspendió una colonia aislada en 45 μL de agua MiliQ estéril y se añadieron 5 μL de lisostafina (1 mg/mL) (Sigma®).
3. La mezcla se vorteoó y se incubó en un baño durante 10 minutos a 37 °C.
4. Se añadieron 45 μL de agua MiliQ estéril, 150 μL de Tris-HCl (0,1 M, pH 8) y 5 μL de proteinasa K (2 mg/mL) (Sigma®).
5. Se vorteoó y se incubó 10 minutos a 60 °C en un baño.
6. Por último, se hirvió durante 5 minutos a 100 °C y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 3 minutos.
7. El ADN se almacenó a -20 °C.

Enterococcus spp.

Para la extracción del ADN de enterococos se utilizó “InstaGene™ Matrix” (Biorad), una matriz encargada de absorber los productos de la lisis celular que interfieren en la reacción PCR. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Se sembraron las cepas en BHI agar y se incubaron durante 24 horas a 37 °C.
2. Se suspendió una colonia aislada en 1 mL de agua MiliQ estéril, se centrifugó durante dos minutos a 12000 r.p.m. y se desechó el sobrenadante.
3. Se resuspendió el precipitado en 200 μL de InstaGene™ Matrix y se incubó durante 20 minutos a 56 °C en un baño.

4. Transcurrido ese tiempo, se vortexó la mezcla y se hirvió a 100 °C durante 8 minutos.
5. Se vortexó de nuevo y se centrifugó durante 3 minutos a 12000 r.p.m.
6. El ADN se almacenó a -20°C.

3.2. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción del ADN plasmídico se siguió el mismo protocolo para estafilococos y enterococos, con algunas excepciones. Se utilizó el kit comercial “Qiagen® Plasmid Purification Midi Kit” (Qiagen®) con algunas modificaciones:

1. Se sembraron las cepas en 2 mL de BHI caldo y se incubaron en agitación durante 24 horas a 37 °C.
2. Se transfirió la suspensión bacteriana a un tubo eppendorf y se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 7000 r.p.m.
3. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µL de Buffer-P1.
4. Se vortexó la mezcla y se añadió:
 - 10 mg/mL de lisozima en el caso de *Enterococcus* spp.
 - 6 µL de lisostafina (1800 U/mL) en el caso de *Staphylococcus* spp.
5. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37 °C.
6. Se añadió 200 µL del Buffer-P2, se invirtió la mezcla en repetidas ocasiones y se incubó en hielo durante 5 minutos.
7. Se añadió 150 µL del Buffer-P3, se invirtió varias veces y se incubó durante 10 minutos en hielo.
8. Se centrifugó durante 30 minutos a 13000 r.p.m. a 4 °C.
9. El sobrenadante se vertió en tubos con 1 mL de etanol absoluto helado y se invirtió repetidas veces.
10. Se incubó durante 1 hora a 4 °C y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 r.p.m. a 4 °C.
11. Se desechó el sobrenadante, se añadió 500 µL de etanol 80% previamente enfriado (sin mezclar) y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 r.p.m. a 4 °C.
12. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado completamente a temperatura ambiente.
13. Por último, se disolvió el precipitado en 30 µL de agua MiliQ estéril.

3.3. Cuantificación del ADN

La concentración y la pureza del ADN extraído se midió mediante el espectrofotómetro y el programa informático Nano-Drop™ (Thermo Scientific™). La concentración fue calculada a través de la absorbancia a 260 nm y la pureza se obtuvo mediante la relación de la absorbancia A260/A280. Una muestra pura de ADN presenta un cociente entre 1,8 y 2,0.

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR permite amplificar un pequeño fragmento de ADN delimitado por una pareja de cebadores específicos. La técnica de PCR se utilizó para el tipado molecular, la detección de mecanismos de resistencia antibióticos y genes de virulencia, y el estudio de entornos genéticos.

La PCR se llevó a cabo en los termocicladores T3 y T3000 Thermocycler (Biometra). Los reactivos utilizados para la PCR, así como sus cantidades, aparecen en la **Tabla 14**. De forma rutinaria, la PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL y en los casos en los que era necesario secuenciar el producto PCR se utilizó un volumen final de 50 μL .

Tabla 14. Reactivos y concentraciones utilizadas en la técnica de PCR.

| Componentes | Concentración inicial | Concentración final | Volumen por tubo (25 μL) | Volumen por tubo (50 μL) |
|--|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Cebador <i>forward</i> (Sigma Aldrich) | 25 μL | 0,5 μL | 0,5 μL | 1 μL |
| Cebador <i>reverse</i> (Sigma Aldrich) | 25 μL | 0,5 μL | 0,5 μL | 1 μL |
| Tampón de reacción NH_4 (Bioline) | 10X | 1X | 2,5 μL | 5 μL |
| MgCl_2 (Bioline) | 50 mM | 1,5 mM | 0,75 μL | 1,5 μL |
| dNTPs (Bioline) | 2,5 mM | 2 mM | 0,5 μL | 1 μL |
| BioTaq ADN polimerasa (Bioline) | 5 U/ μL | 0,03 U/ μL | 0,15 μL | 0,3 μL |
| Agua miliQ estéril | - | - | 15,1 μL | 30,2 μL |
| ADN | - | - | 5 μL | 10 μL |

En todos los casos se incluyó una muestra control positivo y otra muestra control negativo, reemplazando el ADN por el volumen correspondiente de agua miliQ estéril. Los cebadores utilizados para la PCR aparecen en las **Tablas 15-51**.

5. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados por PCR, así como el ADN total o plasmídico extraído, se utilizó la electroforesis horizontal en gel de agarosa. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN en función de su tamaño por la acción de un campo eléctrico.

El gel de agarosa (agarosa D-1; Conda-Pronadisa) se preparó a una concentración de 1-2% en peso en tampón TBE 1X (TBE 5X: 54 g/L Tris-Base; 27,5 g/L ácido bórico; 20 mL EDTA 0,5 M pH 8) y se añadió Midori Green (Nippon Genetic) en una concentración final de 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para poder visualizar los fragmentos de ADN. Se cargaron 10 μL del producto de PCR con 1 μL de tampón de carga (sacarosa 40%; azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%). Las condiciones de electroforesis fueron 45 minutos a 96 V y 120 mA.

Se visualizó el gel con el transiluminador de luz ultravioleta ChemiDoc™ (Bio-Rad) y se fotografió con el software Image Lab™ (Biorad).

6. Identificación de las cepas

6.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF

La identificación a nivel de especie se realizó mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) utilizando el software Biotyper (Bruker).

Para ello, a partir de un cultivo puro crecido durante 24 horas a 37 °C en medio BHI agar se transfirió una pequeña cantidad de bacteria en la placa metálica de 96 pocillos, y se dejó secar a temperatura ambiente. Después, los pocillos fueron cubiertos con 1 µL de matriz alfa-ciano-4 hidroxil ácido cinámico (HCCA; Bruker).

En el caso en los que la cepa no se consiguiera identificar a nivel de especie por este método, se utilizó el protocolo de extracción de proteínas recomendado por Bruker. Se transfirieron 3 colonias crecidas en BHI agar durante 24 horas a 37 °C a un tubo eppendorf y se mezclaron con 300 µL de agua miliQ estéril y 900 µL de etanol absoluto. Se agitó en el vórtex y se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se centrifugó en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y, cuando el precipitado estuvo seco, se resuspendió en 15 µL de ácido fórmico (70%) y 15 µL acetonitrilo. Esta suspensión se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 minutos y se depositó 1 µL del sobrenadante en la placa de MALDI y se cubrió con 1 µL de matriz HCCA.

Para la calibración del espectrómetro se utilizó el perfil proteico de la cepa de *E. coli* DH5 péptido alfa que posee proteínas adicionales (Bruker Daltonics).

6.2. Identificación basada en el gen *nuc*

En las especies que pertenecían al SIG se realizó también la identificación basada en el gen *nuc*, ya que el sistema MALDI-TOF no es siempre capaz de distinguir entre las especies que pertenecen a este grupo. Consiste en una PCR multiplex que, según el tamaño del amplicón, permite identificar las especies *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* y *S. delphini*, y, además, sirve para adscribir los aislados *S. delphini* al grupo A o a al grupo B (Tabla 15).

Tabla 15. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizados para la identificación de las especies del SIG.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|---|---|---|-----------------------------|
| <i>nuc</i> <i>S. delphini</i> grupo A (661 pb) | F: TGAAGGCATATTGTAGAACAA R: CGRTACTTTTCGTTAGGTCC | 95 °C 2 min 1 ciclo | |
| <i>nuc</i> <i>S. delphini</i> grupo B (1135 pb) | F: GGAAGRTTCGTTTTCTCTAGA R: TATGCGATTCAAGAACTGA | 95 °C 30 seg 56 °C 35 seg 30 ciclos 72 °C 1 min | Sasaki <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>nuc</i> <i>S. pseudintermedius</i> (926 pb) | F: TRGGCAGTAGGATTTCGTTAA R: CTTTTGTGCTYCMTTTTGG | 72 °C 2 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|---|--|---|-----------------------------|
| | | 95 °C 2 min 1 ciclo | |
| <i>nuc</i> <i>S. intermedius</i> (430 pb) | F: CATGTCATATTATTGCGAATG R: AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC | 95 °C 30 seg 56 °C 35 seg 30 ciclos 72 °C 1 min | Sasaki <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 72 °C 2 min 1 ciclo | |

7. Tipado molecular

7.1. *spa*-tipo

Todas las cepas *S. aureus* de este estudio se caracterizaron mediante el tipado *spa*. Para ello, se amplificó y secuenció el fragmento variable de la región polimórfica del gen *spa*, utilizando los cebadores y las condiciones que aparecen en la **Tabla 16**. La secuencia obtenida se analizó con el programa Ridom® Staph-Type (Ridom GmbH), el cual asigna automáticamente el tipo *spa* según las repeticiones detectadas. En el caso de detectarse un *spa*-tipo nuevo, la secuencia fue cargada en el servidor Ridom SpaServer (<https://www.spaserver.ridom.de>) y, después de ser comprobada, se le asignó un nuevo tipo de *spa*.

Tabla 16. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para el tipado *spa* de *S. aureus*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|------------------------------|
| | | 80 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>spa</i> (variable) | F: AGACGATCCTTCGGTGAGC R: GCTTTTGCAATGTCATTACTG | 94 °C 45 seg 60 °C 45 seg 35 ciclos 72 °C 1,5 min | Harmsen <i>et al.</i> , 2003 |
| | | 72°C 10 min 1 ciclo | |

7.2. MLST

Para llevar a cabo el tipado por MLST, se amplificaron mediante PCR y se secuenciaron siete genes constitutivos que se encuentran altamente conservados en el genoma de las diferentes especies. Las secuencias obtenidas fueron analizadas para asignar un alelo a cada uno de los genes y, según la combinación alélica, se determinó la secuencia tipo (ST) de cada cepa. Para realizar la comparación de las variantes alélicas se utilizó la base de datos <https://pubmlst.org>.

S. aureus

Para el tipado de *S. aureus* se analizó la secuencia de los genes *arcC* (carbamato quinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *glpF* (glicerol quinasa), *gmk* (guanilato quinasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *tpi* (triosafosfato isomerasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (**Tabla 17**).

Tabla 17. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *S. aureus*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|------------------------------|
| arcC (456 pb) | F: TTGATTACCAGCGCGTATTGTC R: AGGTATCTGCTTCAATCAGCG | | |
| aroE (456 pb) | F: ATCGGAAATCCTATTTACATTTC R: GGTGTTGTATTAATAACGATATC | | |
| glpF (465 pb) | F: CTAGGAACTGCAATCTTAATCC R: TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC | 95 °C 5 min 1 ciclo | |
| gmk (429 pb) | F: ATCGTTTTATCGGGACCATC R: TCATTAACCTACAACGTAATCGTA | 95 °C 1 min 55 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Enright <i>et al.</i> , 2000 |
| pta (474 pb) | F: GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R: GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| tpi (402 pb) | F: TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA R: TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC | | |
| yqiL (516 pb) | F: CAGCATACAGGACACCTATTGGC R: CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC | | |

S. pseudintermedius

En el caso del tipado de las cepas *S. pseudintermedius*, se amplificaron y secuenciaron los genes *ack* (acetato quinasa), *cpn60* (chaperonina 60), *fdh* (formiato deshidrogenasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *purA* (adenilsuccinato sintetasa), *sar* (simporte sodio sulfato) y *tuf* (factor de elongación Tu) (Tabla 18).

Tabla 18. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *S. pseudintermedius*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|---|-------------------------------|
| ack (680 pb) | F: CACCACTTCACAACCCAGCAAAT R: AACCTTCTAATACACGCGCACGCA | 95 °C 1,5 min 1 ciclo | |
| fdh (408 pb) | F: TGCGATAACAGGATGTGCTT R: CTTCTCATGATTCACCGGC | 52 °C 30 seg 72 °C 1 min 35 ciclos | Solyman <i>et al.</i> , 2013 |
| purA (490 pb) | F: GATTACTTCCAAGGTATGTTT R: TCGATAGAGTTAATAGATAAGTC | 94 °C 1 min 52 °C 30 seg | |
| sar (521 pb) | F: GGATTTAGTCCAGTTCAAAATTT R: GAACCATTGCCCCATGAA | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| pta (570 pb) | F: GTGCGTATCGTATTACCAGAAGG R: GCAGAACCCTTTGTGAGAAGC | 95 °C 2 min 1 ciclo | |
| cpn60 (552 pb) | F: GCGACTGTACTTGACACAAGCA R: AACTGCAACCGCTGTAATG | 95 °C 1 min 55 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Bannoehr <i>et al.</i> , 2007 |
| tuf (500 pb) | F: CAATGCCACAAACTCG R: GCTTCAGCGTAGTCTA | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

S. epidermidis

El tipado por MLST de las cepas *S. epidermidis* se realizó mediante la amplificación y posterior secuenciación de los genes *arcC* (carbamato quinasa), *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *gtr* (transportador ABC), *mutS* (pproteína reparadora de errores del ADN), *pyrR* (proteína reguladora del operón pirimidina), *tpi* (triosafosfato isomerasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (**Tabla 19**).

Tabla 19. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *S. epidermidis*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|--|-----------------------------|
| <i>arcC</i> (465 pb) | F: TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG R: TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG | | |
| <i>aroE</i> (420 pb) | F: CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC R: CAAGCGAAATCTGTTGGGG | | |
| <i>gtr</i> (438 pb) | F: CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT R: GTGATTAAGGTATTGATTGAAT | 95 °C 3 min 1 ciclo | |
| <i>mutS</i> (412 pb) | F: GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA R: GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT | 95 °C 30 seg 50 °C 1 min 34 ciclos 72 °C 1 min | Thomas <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>pyrR</i> (428 pb) | F: GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT R: GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>tpi</i> (424 pb) | F: ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC R: TTAATGATGCGCCACCTACA | | |
| <i>yqiL</i> (416 pb) | F: CACGCATAGTATTAGCTGAAG R: CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA | | |

E. faecalis

Para *E. faecalis* se amplificaron y secuenciaron los genes *aroE* (shikimato deshidrogenasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gki* (glucoquinasa), *gyd* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), *pstS* (transportador del casete de unión de ATP-fosfato), *xpt* (xantina fosforribosiltransferasa) y *yqiL* (acetil coenzima A acetiltransferasa) (**Tabla 20**).

Tabla 20. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *E. faecalis*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| <i>aroE</i> (459 pb) | F: TGGAAAACCTTACGGAGACAGC R: GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC | | |
| <i>gdh</i> (530 pb) | F: GGCGCACTAAAAGATATGGT R: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>gki</i> (438 pb) | F: GATTTTGTGGGAATTGGTATGG R: ACCATTAAAGCAAATGATCGC | 94 °C 30 seg 52 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1 min | Ruiz-Garbajosa <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>gyd</i> | F: CAAACTGCTTAGCTCCAAGGC | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| (395 pb) | R: CATTTCGTTGTCATACCAAGC | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>pstS</i> (583 pb) | F: CGGAACAGGACTTTTCGC R: ATTTACATCACGTTCTACTTGC | 94 °C 30 seg 52 °C 30 seg 30 ciclos | Ruiz-Garbajosa <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>xpt</i> (456 pb) | F: AAAATGATGGCCGTGTATTAGG R: AACGTCACCGTTCCTTCACTTA | 72 °C 1 min | |
| <i>yqiL</i> (436 pb) | F: CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG R: GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

E. faecium

En el caso de las cepas *E. faecium* los genes que se utilizaron para el tipado por MLST fueron *adk* (adenilato quinasa), *atpA* (ATP sintasa), *ddl* (d-alanina-d-alanina ligasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), *pstS* (transportador del casete de unión de ATP-fosfato) y *purK* (fosforibosil-aminoimidazol carboxilasa subunidad ATPasa) (Tabla 21).

Tabla 21. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación de los siete genes utilizados para el tipado por MLST de *E. faecium*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------------------------|---|--|----------------------------|
| <i>adK</i> (437 pb) | F: TATGAACCTCATTTTAATGGG R: GTTGACTGCCAAACGATTTT | | |
| <i>atpA</i> (556 pb) | F: CGGTTCATACGGAATGGCACA R: AAGTTCACGATAAGCCACGG | | |
| <i>ddl</i> (465 pb) | F: GAGACATTGAATATGCCTTAT R: AAAAAGAAATCGCACCG | 95 °C 3 min 1 ciclo | |
| <i>gdh</i> (530 pb) | F: GGCGCACTAAAAGATATGGT R: CCAAGATTGGCAACTTCGTCCCA | 93 °C 30 seg 50 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 30 seg | Homan <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>gyd</i> (395 pb) | F: CAAACTGCTTAGCTCCAAGGC R: CATTTCGTTGTCATACCAAGC | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>pstS</i> (583 pb) | F: TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGA R: CGTGATCACGTTCTACTTCC | | |
| <i>purK</i> (492 pb) | F: GCAGATTGGCACATTGAAAGT R: TACATAAATCCCGCCTGTTTY | | |

7.3. PCR específica para *S. aureus* del CC398

La detección de las cepas *S. aureus* pertenecientes al complejo clonal CC398 se llevó a cabo mediante una PCR que amplifica el gen *sau1-hsdS1*, específico de esta línea genética (Tabla 22).

Tabla 22. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación del gen *sau1-hsdS1*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los primers (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|-------------------------------|--|---|------------------------------|
| | | 95° C 12 min 1 ciclo | |
| <i>sau1-hsdS1</i> (296 pb) | F: AGGGTTTGAAGGCGAATGGG R: CAGTATAAAGAGGTGACATGACCCCT | 95° C 30 seg 61 °C 30 seg 35 ciclos 72 °C 1 min | Stegger <i>et al.</i> , 2011 |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

7.4. Tipado del locus *agr*

S. aureus

Las cepas *S. aureus* fueron tipadas según su locus *agr*. Se utilizaron dos PCRs dobles (Tabla 23); en la primera PCR se amplificaron los tipos I y II, y en la segunda los tipos III y IV.

Tabla 23. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para el tipado del *agr* de *S. aureus*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|------------------------|------------------------------|
| <i>agr I</i> (440 pb) | F: GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT R: ATGCACATGGTGCACATGC | | |
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>agr II</i> (572 pb) | F: GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC R: ATGCACATGGTGCACATGC | 52 °C 15 seg | |
| | | 55 °C 30 seg 30 ciclos | Shopsin <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>agr III</i> (406 pb) | F: CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC R: ATGCACATGGTGCACATGC | 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>agr IV</i> (656 pb) | F: CGATAATGCCGTAATACCCG R: ATGCACATGGTGCACATGC | | |

S. pseudintermedius

Para el tipado por *agr* de las cepas *S. pseudintermedius*, se amplificó y secuenció el gen *agrD*, con el fin de conocer su variante alélica (Tabla 24).

Tabla 24. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación utilizadas para el tipado del *agr* de *S. pseudintermedius*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|---|-------------------------------|
| | | 94 °C 2min 1 ciclo | |
| <i>agrD</i> (300 pb) | F: GGGGTA TTATTACAATCATT R: CTGATGCGAAAATAAAGGATTG | 94 °C 15 seg 45 °C 30 seg 35 ciclos 72 °C 1 min | Bannoehr <i>et al.</i> , 2007 |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

7.5. PFGE

Se estudió la relación clonal de algunas cepas de interés mediante la técnica de PFGE. El protocolo que se siguió fue diferente dependiendo del género bacteriano.

Staphylococcus spp.

Preparación de los insertos: A partir de un cultivo puro de 24 horas en BHI agar, se inoculó una colonia en 1 mL de BHI caldo y se incubó a 37 °C durante 24 horas. De este cultivo se recogieron 200 µL que se transfirieron a un tubo eppendorf y se centrifugaron durante 2 minutos a 13 000 r.p.m. El precipitado se disolvió en 200 µL de una solución de TBE 0,5X (Tris-HCl 89 mM, pH 8,3; ácido bórico 2 mM; EDTA pH 8). Se preparó agarosa de alta pureza (*Pulsed Field Certified Agarose*, BioRad) al 2% en buffer TBE y se mantuvo a 50 °C en un baño. Se mezclaron 200 µL de la suspensión bacteriana en TBE con 200 µL de agarosa y se distribuyó en los moldes adecuados para los insertos, dejándose solidificar durante 10 minutos a 4 °C. Se prepararon tres insertos por cepa.

Lisis de la pared bacteriana: Los insertos se incubaron en agitación a 37 °C durante, al menos, 2 horas en 3 mL de solución de lisis EC (Tris-HCl 6 mM, pH 7,6; NaCl 1M; EDTA 100 mM, pH 8; Brij58 0,5%; sarcosil 0,52%; ácido deoxicólico 0,2%), a la que se añadió en el momento lisostafina 100 µg/mL.

Ruptura de la membrana celular: Se eliminó la solución de lisis y se añadieron 3 mL de solución de proteólisis (EDTA 0,5 M, pH 9,5; sarcosil 1%; 50 µg/mL proteinasa K), y se incubaron en agitación desde 4 horas a *overnight* a 56 °C.

Lavados de los insertos: Se eliminó la solución de proteólisis y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8) en agitación a 37 °C. Tras los lavados, los insertos pueden guardarse en solución TE a 4 °C hasta un año para su posterior uso.

Digestión enzimática: Se cortó la mitad de un inserto y se colocó en un tubo eppendorf al que se adicionaron 100 µL de solución de digestión: 10U de la enzima *Sma*I (New England Biolabs® Inc.), 11 µL de CutSmart® (New England Biolabs® Inc.), y agua miliQ estéril para completar el volumen. Se dejó incubar de 4-24 horas a 25 °C.

Electroforesis: Se preparó un gel de agarosa D-5 (Conda-Pronadisa) al 1,2% en buffer TBE 0,5X y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se introdujeron los insertos en los pocillos, dejando al menos dos de ellos para el marcador de peso molecular Lambda PFG Ladder (New England Biolabs® Inc.) y se sellaron los pocillos con agarosa a 50 °C. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X, al que se añadió tiourea (aproximadamente 75 µM). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm², y se empleó una rampa lineal pulsada de 5 a 50 segundos durante 22 horas a 14 °C.

Tinción y visualización del gel: El gel se tiñó en una solución acuosa de bromuro de etidio (10 µL en 200 mL de agua destilada) durante 30 minutos en agitación. Se visualizó el gel en el transiluminador ultravioleta ChemiDoc™ (Bio-Rad) y se fotografió con el software Image Lab™ (Biorad). Según el resultado obtenido, el gel se destiñó tantas veces como fue necesario con agua miliQ.

Análisis de los patrones de PFGE: Los patrones de PFGE fueron analizados y comparados siguiendo las directrices propuestas por Tenover *et al.*, 1995. De este modo, fueron clasificados en indistinguibles, estrechamente relacionados, posiblemente relacionados o diferentes. Así, se le asignó una letra a cada patrón de PFGE diferente, y números a los diferentes subtipos dentro de un mismo patrón.

Enterococcus spp.

Preparación de los insertos: A partir de un cultivo puro de 24 horas en BHI agar, se inoculó una colonia en 1 mL de BHI caldo y se incubó a 37 °C durante 24 horas. De este cultivo se recogieron 200 µL que se transfirieron a un tubo eppendorf y se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 r.p.m. El precipitado se disolvió en 1 mL de solución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8). Se preparó agarosa de alta pureza al 2% en buffer TE y se mantuvo a 50 °C en un baño. Se mezclaron 500 µL de la suspensión bacteriana en TE con 500 µL de agarosa y se distribuyó en los moldes adecuados para los insertos dejándose solidificar durante 10 minutos a 4 °C. Se prepararon 3 insertos por cepa.

Lisis de la pared bacteriana: Los insertos se incubaron en agitación a 37 °C durante, al menos, 2 horas en 3 mL de solución de lisis EC (Tris-HCl 6 mM, pH 7,6, NaCl 1 M; EDTA 100 mM, pH 8; Brij58 0,5%; sarcosil 0,2%; ácido deoxicólico 0,2%), a la que se añadió en el momento 1 mg/mL de lisozima.

Ruptura de la membrana celular: Se eliminó la solución de lisis EC y se añadieron 3 mL de solución ESP (EDTA 0,5 M, pH 9,5; sarcosil 1%; 50 µg/mL proteinasa K), y se incubaron en agitación desde 4 horas a *overnight* a 56 °C.

Lavados de los insertos: Se eliminó la solución ESP y se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con solución TE en agitación, 3 de ellos a 56 °C y uno a temperatura ambiente. Tras los lavados, los insertos pueden guardarse en solución TE a 4 °C hasta 1 año, para su posterior digestión.

La digestión enzimática, electroforesis, tinción y visualización del gel, y el análisis de los patrones de PFGE se realizó como aparece en el aparatado de *Staphylococcus* spp.

7.6. Tipado del SCC mec

En las cepas *Staphylococcus* spp. que presentaron genes de resistencia a metilicina se llevó a cabo el tipado del SCC mec siguiendo dos esquemas diferentes. En primer lugar, se realizaron diferentes PCRs simples y múltiples para determinar el tipo de *ccr* y complejo *mec* (Tabla 25).

Tabla 25. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación para el tipado del SCC mec con los cebadores de Kondo *et al.*, 2007.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|-------------------------------|
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>ccrC</i> (336 pb) | F: CACTTAATCCATGTACACAG R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA | 94 °C 1 min 50 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min | Witte <i>et al.</i> , 2007 |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|---------------------------------|---|---|-------------------------------|
| ccrA1-ccrB (695 pb) | F: AACCTATATCATCAATCAGTACGT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT | 94 °C 2 min 1 ciclo | |
| ccrA2-ccrB (937 pb) | F: TAAAGGCATCAATGCACAAACACT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT | 94 °C 2 min 57 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 3 min | Kondo <i>et al.</i> , 2007 |
| ccrA3-ccrB (1791 pb) | F: AGCTCAAAGCAAGCAATAGAAT R: ATTGCCTTGATAATAGCCITCT | 72 °C 7min 1 ciclo | |
| ccrA4-ccrB4 (1287 pb) | F: TTTGAATGCCCTCCATGAATAAAAT R: AGAAAAGATAGAAGTTCGAAAGA | | |
| mecA-mecI (1963 pb) | F: CATAACTTCCCATTCTGCAGATG R: ATATACCAAACCCGACAACACTACA | 92 °C 2,5 min 1 ciclo | |
| mecA-IS1272 (2827 pb) | F: ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG R: ATATACCAAACCCGACAACACTACA | 93 °C 2 min 60 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 3 min | Kondo <i>et al.</i> , 2007 |
| mecA-IS431 (804 pb) | F: TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT R: ATATACCAAACCCGACAACACTACA | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

Por otro lado, se realizaron PCRs específicas para determinar los tipos y subtipos de SCC*mec* (Tabla 26).

Tabla 26. Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación para el tipado del SCC*mec* con los cebadores de Zhang *et al.*, 2015.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------------------------------|---|---|----------------------------|
| SCC<i>mec</i> I (613 pb) | F: GCTTTAAAGAGTGTCGTTACAGG R: GTTCTCTCATAGTATGACGTCC | | |
| SCC<i>mec</i> II (398 pb) | F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC | | |
| SCC<i>mec</i> III (280 pb) | F: CCATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| SCC<i>mec</i> IVa (776 pb) | F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTIONTCTGAAAAGCGTCC | 94 °C 45 seg 65 °C 45 seg 10 ciclos 72 °C 1,5 min | Zhang <i>et al.</i> , 2005 |
| SCC<i>mec</i> IVb (493 pb) | F: TCTGGAATTACTIONTCTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC | 72 °C 7min 1 ciclo | |
| SCC<i>mec</i> IVc (200 pb) | F: ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG | 94 °C 45 seg 55 °C 45 seg 25 ciclos 72 °C 1,5 min | |
| SCC<i>mec</i> IVd (881 pb) | F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAG | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| SCC<i>mec</i> V (325 pb) | F: GAACATTGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAGTTGTACCCTTGACACC | | |

8. Determinación de los mecanismos de resistencia a antibióticos

Resistencia a meticilina

En las cepas de *Staphylococcus* spp. que presentaron resistencia a meticilina, se analizó la presencia de los genes de resistencia *mecA*, *mecB* y *mecC* (Tabla 27).

Tabla 27. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a meticilina.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|------------------------------|
| <i>mecA</i> (527 pb) | F: GGGATCATAGCGTCATTATTC R: AACGATTGTGACACGATAGCC | 94 °C 5 min 1 ciclo | Poulsen <i>et al.</i> , 2003 |
| | | 94 °C 30 seg 55 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>mecB</i> (456 pb) | F: TTAACATATACACCCGCTTG R: TAAAGTTCATTAGGCACCTCC | 95 °C 5 min 1 ciclo | Becker <i>et al.</i> , 2018 |
| | | 95 °C 30 seg 57 °C 30 seg 35 ciclos 72 °C 2,5 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>mecC</i> (304 pb) | F: GCTCCTAATGCTAATGCA R: TAAGCAATAATGACTACC | 95 °C 2 min 1 ciclo | Cuny <i>et al.</i> , 2011 |
| | | 94 °C 30 seg 50 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 30 seg | |
| | | 72 °C 4 min 1 ciclo | |

Resistencia a penicilina y ampicilina

En las cepas que presentaron resistencia a penicilina, se investigó la presencia del gen *blaZ* y en las cepas SARM portadoras del gen *mecC* el gen *blaZ* asociado al SCC*mec* XI. En los aislados *S. arlettae* se investigó el gen *bla_{ARL}*, específico de esta especie. En los enterococos que presentaron resistencia de alto nivel a penicilina y ampicilina, se analizaron los cambios aminoacídicos en la PBP5 mediante PCR y posterior secuenciación (Tabla 28). Para la detección de los cambios aminoacídicos se compararon las secuencias obtenidas con *E. faecium* DO (GenBank CP003583).

Tabla 28. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a penicilina y ampicilina.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| <i>blaZ</i> (772 pb) | F: CAGTTCACATGCCAAAGAG R: TACACTCTTGCGGTTTC | 94 °C 3 min 1 ciclo | Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 |
| | | 94 °C 1 min 50 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--|--|---|--|
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| bla_{Z-SCmecXI} (809 pb) | F: AGTCGTGTTAGCGTTGATATTA R: CAATTCAGCAACCTCACTACTA | 94 °C 1 min 58 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min | García-Álvarez <i>et al.</i> , 2011 |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| bla_{ARL} (378 pb) | F: CTATCTTTGTCTTACTCTGTGT R: GCMTGACGTGCTGCTTTGTGC | 94 °C 1 min 55 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Andreis <i>et al.</i> , 2017 |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| pbp5 (C-terminal) (861 pb) | F: CGGGATCTCACAAGAAGAT R: TTATTGATAATTTTGTT | 94 °C 30 seg 52 °C 1 min 35 ciclos 72 °C 1 min | Hsieh <i>et al.</i> , 2006 |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| | | 95 °C 15 min 1 ciclo | |
| pbp5 (N-terminal) (1140 pb) | F: AAAAATCGAACAGGCGCTTA R : TTGTGAGATCCCGTTTGCA | 94 °C 30 seg 55 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 2 min | Jureen <i>et al.</i> , 2003 |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

Resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas

En las cepas que presentaron resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas, se analizó la presencia de los genes que aparecen en la **Tabla 29**. Los genes *sal(A)* y *msr(C)* son intrínsecos en las especies *S. sciuri* y *E. faecium*, respectivamente.

Tabla 29. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas y/o estreptograminas.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|---|-----------------------------------|
| erm(A) (645 pb) | F: TCTAAAAGCATGTAAAAGAA R: CTTGATAGTTTATTAATATTAG | 93 °C 3 min 1 ciclo | |
| erm(B) (639 pb) | F: GAAAAGTACTCAACCAATA R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTA | 93 °C 1 min 52 °C 1 min 35 ciclos 72 °C 1 min | Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996 |
| erm(C) (642 pb) | F: TCAAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT | 72 °C 5 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|------------------------|----------------------------------|
| erm(T) (200 pb) | F: CCGCCATTGAAATAGATCCT R: TTCTGTAGCTGTGCTTTCAAAAA | 94 °C 3 min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 55 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| erm(43) (609 pb) | F: TACAGCAGATGATAACATTG R: GTTGTTTCGATATTTTATTTAAG | 94 °C 3 min 1 ciclo | Schwendener y Perreten, 2012 |
| | | 94 °C 30 seg | |
| | | 50 °C 30 seg 30 ciclos | |
| | | 72 °C 40 seg | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| msr(A) (399 pb) | F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT | 95 °C 3 min 1 ciclo | Wondrack <i>et al.</i> , 1996 |
| | | 93 °C 30 seg | |
| | | 55 °C 2 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1,5 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| msr(C) (361 pb) | F: CTAGATGGGTTGTTGGCTCGT R: AGCTTTGGCAACCAGCTAGAA | 94 °C 7 min 1 ciclo | Este estudio |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 60 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| mph(C) (900 pb) | F: ATGACTCGACATAATGAAAT R: CTA CTCTTCATACCTAACTC | 94 °C 3 min 1 ciclo | Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 45 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| Inu(A) (323 pb) | F: GGTGGCTGGGGGTAGATGTATTAACGG R: GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTCGATC | 94 °C 2 min 1 ciclo | Lina <i>et al.</i> , 1999b |
| | | 94 °C 30 seg | |
| | | 57 °C 30 seg 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| Inu(B) (944 pb) | F: CCTACCTATTGTTTGGGAA R: ATAACGTTACTCTCCTATTC | 94 °C 5 min 1 ciclo | Bozdogan <i>et al.</i> , 1999 |
| | | 94 °C 45 seg | |
| | | 54 °C 45 seg 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|-----------------------|---------------------------------|
| vga(A) (1264 pb) | F: AGTGGTGGTGAAGTAACACG R: GGTTCAATACTCAATCGACTGAG | 94 °C 3 min 1 ciclo | Lozano <i>et al.</i> , 2012a |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 56 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| isa(B) (396 pb) | F: TGCCGAAGCCATGTACCGTCC R: CGGTTAGACCAACCAGCCGAACG | 94 °C 3 min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 56 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| sal(A) (610 pb) | F: CTATTAATCGATGAACCAACAAACC R: TTGATTTACCTGTACCATTTCTGC | 94 °C 7 min 1 ciclo | Hot <i>et al.</i> , 2014 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 52 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

Resistencia a aminoglucósidos

En la **Tabla 30** aparecen los genes de resistencia que se estudiaron en aquellas cepas que presentaron resistencia a aminoglucósidos. El gen *aac(6)-li* es intrínseco en la especie *E. faecium*.

Tabla 30. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a aminoglucósidos.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--|---|------------------------|---------------------------------------|
| aac(6)-le-aph(2'')-la (220 pb) | F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATAACCACTACCG | 94 °C 5 min 1 ciclo | van de Klundert y Vliegthart, 1993 |
| | | 94 °C 30 seg | |
| | | 60 °C 45 seg 30 ciclos | |
| | | 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| ant(4)-la (165 pb) | F: GCAAGGACCGACAACATTTTC R: TGGCACAGATGGTCATAACC | 94 °C 3 min 1 ciclo | van de Klundert y Vliegthart, 1993 |
| | | 94 °C 30 seg | |
| | | 60 °C 45 seg 30 ciclos | |
| | | 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| ant(6)-la (597 pb) | F: ACTGGCTTAATCAATTTGGG R: TTATTGATAATTTGGTT | 94 °C 5 min 1 ciclo | Clark <i>et al.</i> , 1999 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 58 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------------------------|---|------------------------|---|
| <i>str</i> (646 pb) | F: TATTGCTCTCGAGGGTTC R: CTTTCTATATCCATTCATCTC | 94 °C 3 min 1 ciclo | Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 50 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>aph(3')-III</i> (292 pb) | F: GCCGATGTGGATTGCGAAAA R: GCTTGATCCCCAGTAAGTCA | 94 °C 3 min 1 ciclo | van de Klundert y Vliegenthart, 1993 |
| | | 94 °C 30 seg | |
| | | 60 °C 45 seg 32 ciclos | |
| | | 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>aac(6')-II</i> (323 pb) | F: GCGGTAGCAGCGGTAGACCAAG R: GCATTTGGTAAGACACCTACG | 94 °C 2 min 1 ciclo | Costa <i>et al.</i> , 1993 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 55 °C 2 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 3 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

Resistencia a tetraciclinas

Se analizó la presencia de los genes *tet(K)*, *tet(L)* y *tet(M)* de resistencia a tetraciclina en las cepas de *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp con resistencia a este antibiótico, además, el gen *tet(O)* se estudió en las cepas de *Enterococcus* spp. (Tabla 31).

Tabla 31. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a tetraciclinas.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|-----------------------|--------------------------------|
| <i>tet(K)</i> (697 pb) | F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTATTCCAGAAGCA | 94 °C 1 min 1 ciclo | Aarestrup <i>et al.</i> , 2000 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 55 °C 2min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 2 min | |
| <i>tet(M)</i> (576 pb) | F: GTTAAATAGTGTCTTGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 1 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 1 min | |
| <i>tet(L)</i> (456 pb) | F: CATTGGTCTTATTGGATCG R: ATTACACTCCGATTTCCGG | 50 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>tet(O)</i> (615 pb) | F: GATGGCATAAGGCACAGAC R: CAATATCACCAGAGCAGGCT | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

Resistencia a quinolonas

Para estudiar la resistencia a quinolonas, se analizaron los cambios aminoacídicos en los genes codificantes de las proteínas GyrA y GrlA en estafilococos, y GyrA y ParC en enterococos (Tabla 32). Para ello se amplificaron y secuenciaron los genes *gyrA*, *grlA* y *parC* y se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia: *S. aureus* NCTC 8325 (GenBank CP000253), *S. epidermidis* ATCC® 12228 (GenBank CP022247), *S. haemolyticus* ATCC® 29970 (GenBank CP035291), *S. lentus* NCTC12102 (GenBank UHDR01000002), *S. sciuri* NCTC12103 (GenBank LS483305), *S. xylosus* NCTC11043 (GenBank UHEI01000002), *E. faecium* DO (GenBank CP003583) y *E. faecalis* ATCC® 29212 (GenBank CP008816).

Tabla 32. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes *gyrA*, *grlA* y *parC* de las diferentes especies.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|--|---|---|----------------------------------|
| <i>gyrA</i> <i>S. aureus</i> (222 pb) | F: AATGAACAAGGTATGACACC R: TACGCGCTTCAGTATAACGC | 94 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>grlA</i> <i>S. aureus</i> (559 pb) | F: ACTTGAAGATGTTTTAGGTGAT R: TTAGGAAATCTTGATGGCAA | 94 °C 20 seg 55 °C 20 seg 25 ciclos 72 °C 50 seg 72 °C 5 min 1 ciclo | Schmitz, 1998 |
| <i>gyrA</i> <i>S. epidermidis</i> (284 pb) | F: ATGCGTGAATCATTCTTAGACTATGC R: GAGCCAAAGTTACCTTGACC | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| <i>grlA</i> <i>S. epidermidis</i> (197 pb) | F: TCGCAATGTATTCAAGTGGG R: ATCGTTATCGATACTACCATT | 94 °C 30 seg 55 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1 min 72 °C 5 min 1 ciclo | Yamada <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>gyrA</i> SCoN (382 pb) | F: TTAAATGAACAAGGTATGAC R: GCCATACCTACCGCGATACC | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>grlA</i> SCoN (245 pb) | F: AATACRYAYGATAARAATTTCCG R: GTYGTRTCATCATAGTTTGG | 94 °C 1,5 min 45 °C 2,5 min 25 ciclos 72 °C 4,5 min 72 °C 10 min 1 ciclo | Takahata <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>gyrA</i> <i>Enterococcus</i> spp. (240 pb) | F : CGGGATGAACGAATTGGGTGTGA R: AATTTTACTCATACGTGCTTCGG | 95 °C 15 min 1 ciclo | |
| <i>parC</i> <i>Enterococcus</i> spp. (151 pb) | F: TTCCCGTGCATTTTCGATCAGTACTTC R : CGTATGACAAAGGATTCGGTAAATC | 94 °C 30 seg 52 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1 min 72 °C 7 min 1 ciclo | Leavis <i>et al.</i> , 2006 |

Resistencia a fenicoles

En las cepas que presentaron resistencia a fenicoles se analizó la presencia de los genes *fexA*, *fexB*, *cat_{pC194}*, *cat_{pC221}*, *cat_{pC223}* y *catA* (Tabla 33).

Tabla 33. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a fenicoles.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|--|--|---|----------------------------------|
| | | 94 °C 1 min 1 ciclo | |
| fexA (1272 pb) | F: G T A C T T G T A G G T G C A A T T A C G G C T G A R: C G C A T C T G A G T A G G A C A T A G C G T C | 94 °C 1 min 48 °C 2 min 34 ciclos 72 °C 3 min | Kehrenberg y Schwarz, 2005 |
| | | 72 °C 7min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| fexB (816 pb) | F: T T C C C A C T A T T G G T G A A A G G A T R: G C A A T T C C C T T T T A T G G A C G T T | 94 °C 1 min 55 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | H. Liu <i>et al.</i> , 2012 |
| | | 72 °C 10min 1 ciclo | |
| cat_{pc194} (570 pb) | F: C G A C T T T T A G T A T A A C C A C A G A R: G C C A G T C A T T A G G C C T A T | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| cat_{pc221} (434 pb) | F: A T T T A T G C A A T T A T G G A A G T T G R: T G A A G C A T G G T A A C C A T C A C | 94 °C 1 min 50 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 |
| cat_{pc223} (283 pb) | F: G A A T C A A A T G C T A G T T T T A A C T C R: A C A T G G T A A C C A T C A C A T A C | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| catA (505 pb) | F: G G A T A T G A A A T T T A T C C C T C R: C A A T C A T C T A C C C T A T G A A T | 94 °C 1 min 50 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2,5 min | Aarestrup <i>et al.</i> , 2000 |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

Resistencia a oxazolidinonas

Los genes de resistencia *optrA*, *poxtA*, *cfr*, *cfr(B)* y *cfr(D)* se analizaron en las cepas que presentaban resistencia a linezolid (**Tabla 34**).

Tabla 34. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a oxazolidinonas.

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'⇒3') | Condiciones | Referencia |
|---------------------------------------|--|---|----------------------------|
| | | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| optrA¹ (1395 pb) | F: A G G T G G T C A G C G A A C T A A R: A T C A A C T G T T C C C A T T C A | 94 °C 1 min 48 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Wang <i>et al.</i> , 2015b |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--|--|---|-------------------------------|
| | | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>poxtA</i> ² (791 pb) | F: TCAATGCAGAGCAGGAAGCA R: GGTGGATTTACCGACACCGT | 94 °C 1 min 60 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Este estudio |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| <i>cfr</i> ³ (746 pb) | F: TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC | 94 °C 1 min 56 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Kehrenberg y Schwarz, 2006 |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| <i>cfr(B)</i> ³ (293 pb) | F: TGAGCATATACGAGTAACCTCAAGA R: CGCAAGCAGCGTCTATATCA | 94 °C 30 seg 58 °C 30 seg 35 ciclos 72 °C 1 min | Lee <i>et al.</i> , 2017 |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>cfr(D)</i> ³ (595 pb) | F: AGAAGTCGCAACAAGTGAGGA R: GCAACTGCATGAGTCAAAGAA | 94 °C 1 min 60 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Este estudio |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

¹El gen *oprA* confiere resistencia a oxazolidinonas y fenicoles.

²El gen *poxtA* confiere resistencia a oxazolidinonas, fenicoles y tetraciclinas.

³El gen *cfr* y sus variantes confieren resistencia a oxazolidinonas, fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptograminas.

Además, se estudió la presencia de mutaciones en el dominio V del ARNr 23S y cambios aminoacídicos en los genes codificantes de las proteínas ribosomales L3 (*rpIC*), L4 (*rpID*) y L22 (*rpIV*) mediante PCR y secuenciación (**Tabla 35**). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia: *S. aureus* NCTC 8325 (GenBank CP000253), *S. epidermidis* ATCC[®] 12228 (GenBank CP022247), *S. equorum* KM1031 (GenBank CP013980), *S. arlettae* NCTC12413 (GenBank UGZE01000001), *E. faecium* DO (GenBank CP003583) y *E. faecalis* ATCC[®] 29212 (GenBank CP008816).

Tabla 35. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del dominio V del ARNr 23S y las proteínas ribosomales L3, L4 y L22.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|---|---------------------------|
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| ARNr 23S (420 pb) | F: GCGGTCGCCTCCTAAAAG R: ATCCCGGTCCTCTCGTACT | 94 °C 1 min 54 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | Dibo <i>et al.</i> , 2004 |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|---|--|------------------------|-----------------------------|
| rpIC (L3) <i>Staphylococcus</i> spp. (799 pb) | F: ACCCTGATTTAGTCCGTCTA R: GTTGACGCTTTAATGGGCTTA | 94 °C 5 min 1 ciclo | Miller <i>et al.</i> , 2008 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 52 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| rpID (L4) <i>Staphylococcus</i> spp. (1080 pb) | F: TCGCTTACCTCCTTAATG R: GGTGGAAACACTGTAACGT | 94 °C 5 min 1 ciclo | Mendes <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 54 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| rpIV (L22) <i>Staphylococcus</i> spp. (468 pb) | F: CAACACGAAGTCCGATTGGA R: GCAGACGACAAGAAAACAAG | 94 °C 5 min 1 ciclo | Mendes <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 52 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| rpIC (L3) <i>Enterococcus</i> spp. (618 pb) | F: ATGACCAAAGGAATCTTAGGG R: CACAGCTGATTTGATWGTGATT | 94 °C 7 min 1 ciclo | Diaz <i>et al.</i> , 2012 |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 55 °C 1 min 35 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| rpID (L4) <i>Enterococcus</i> spp. (617 pb) | F: GCCGAATGTAGCATTATTTCAA R: CAAGCACCTCCTCAATTTGAGT | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| | | | |
| | | | |
| rpIV (L22) <i>E. faecalis</i> (476 pb) | F: GCCACGTTGCTGACGATAA R: ACCCACTGATTGTCCTCCT | 94 °C 3 min 1 ciclo | Lee <i>et al.</i> , 2017 |
| | | 94 °C 45 seg | |
| | | 54 °C 45 seg 35 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| rpIV (L22) <i>E. faecium</i> (486 pb) | F: GGACATGCTGCTGACGATA R: ACCATTTAGCATCCAGTCG | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| | | | |

Resistencia a vancomicina

Se investigó la presencia de los genes *vanA* y *vanB* en las cepas que mostraron resistencia a vancomicina (Tabla 36).

Tabla 36. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a vancomicina.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|------------------------|-------------------------------|
| vanA (399 pb) | F: ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG R: TCCACCTCGCCAACAACACTAACC | 96 °C 2 min 1 ciclo | Woodford <i>et al.</i> , 1993 |
| | | 94 °C 30 seg | |
| | | 50 °C 30 seg 35 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

| | | | |
|-------------------------|---|--|---------------------------|
| | | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| vanB (484 pb) | F: CAAAGCTCCGCAGCTTGCATG R: TGCATCCAAGCACCCGATATAC | 94 °C 30 seg 58 °C 2 min 35 ciclos 72 °C 2 min | Dahl <i>et al.</i> , 1999 |
| | | 72 °C 6 min 1 ciclo | |

Resistencia a mupirocina

El gen de resistencia *mupA* se analizó en las cepas que mostraron resistencia de alto nivel a mupirocina (Tabla 37).

Tabla 37. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *mupA*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|--|--|--------------------------|
| | | 94 °C 5 min 1 ciclo | |
| mupA (419 pb) | F: CCCATGGCTTACCAGTTGA R: CCATGGAGCACTATCCGAA | 94 °C 3 min 60 °C 45 seg 32 ciclos 72 °C 1 min | Udo <i>et al.</i> , 2003 |
| | | 72 °C 2 min 1 ciclo | |

Resistencia a ácido fusídico

En las cepas resistentes a ácido fusídico se analizó la presencia de los genes *fusB*, *fusC* y *fusD* (Tabla 38). El gen *fusD* es intrínseco en la especie *S. saprophyticus*.

Tabla 38. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a ácido fusídico.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|--|-----------------------------|
| | | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| fusB (431 pb) | F: CTATAATGATATTAATGAGATTTTTGG R: TTTTACATATTGACCATCCGAATTGG | 94 °C 30 seg 57 °C 30 seg 25 ciclos 72 °C 45 seg | Mclaws <i>et al.</i> , 2008 |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| fusC (332 pb) | F: TTAAGAAAAAGATATTGATATCTCGG R: TTTACAGAATCCTTTACTTTATTGG | | |
| | | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| fusD (465 pb) | F: AATTCGGTCAACGATCCC R: GCCATCATTGCCAGTACG | 94 °C 30 seg 57 °C 30seg 30 ciclos 72 °C 30 seg | Chen <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

Resistencia a trimetoprim

En las cepas que presentaron resistencia a trimetoprim se analizaron los genes *dfrA*, *dfrD*, *dfrG* y *dfrK* (Tabla 39).

Tabla 39. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de resistencia a trimetoprim.

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <i>dfrA</i> (374 pb) | F: CCTTGGCACTTACCAAATG | 94 °C 3 min 1 ciclo | Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 |
| | R: CTGAAGATTCGACTTCCC | 94 °C 1 min | |
| <i>dfrD</i> (582 pb) | F: TTCTTTAATTGTTGCGATGG | 50 °C 1 min 30 ciclos | Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 |
| | R: TTAACGAATTCTCATATATATG | 72 °C 1 min | |
| <i>dfrG</i> (323 pb) | F: TCGGAAGAGCCTTACCTGACAGAA | 72 °C 5 min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010 |
| | R: CCCTTTTTGGGCAAATACCTCATTCCA | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| <i>dfrK</i> (423 pb) | F: GAGAATCCCAGAGGATTGGG | 94 °C 1 min | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010 |
| | R: CAAGAAGCTTTTCGCTCATAAA | 56 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 3 min 1 ciclo | |
| | | 94 °C 1min | |
| | | 56 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |

9. Estudio de los factores de virulencia

Mediante PCR, se estudió la presencia de diferentes genes codificantes de factores de virulencia de interés en las cepas de *Staphylococcus* spp.: leucocidinas (*lukS/F-PV*, *luk-PQ*), toxinas exfoliativas (*eta*, *etb*, *etd*, *etd2*) y toxina del síndrome del shock tóxico (*tst*) (Tabla 40).

Tabla 40. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de virulencia en *Staphylococcus* spp.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>lukS/F-PV</i> (443 pb) | F: ATCATTAGGTAAATGTCTGGACATGATCCA | 94 °C 5 min 1 ciclo | Lina <i>et al.</i> , 1999a |
| | R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAGC | 94 °C 30 seg | |
| <i>luk-PQ</i> (939 pb) | F: CCTGATGGTGAAGTGTGACGCGCAT | 55 °C 30 seg 30 ciclos | Koop <i>et al.</i> , 2017 |
| | R: TTGTGTGCCTCGACACCCCAAC | 72 °C 1min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|--|--------------------------------|
| <i>eta</i> (190 pb) | F: ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT R: TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC | 94 °C 5 min 1 ciclo | Jarraud <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>etb</i> (612 pb) | F: CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC R: AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC | 94 °C 30 seg 55 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1min | |
| <i>etd</i> (376 pb) | F: AACTATCATGTATCAAGG R: CAGAATTTCCCGACTCAG | 72 °C 10 min 1 ciclo | Yamaguchi <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>etd2</i> | F: TCAAGACACCACTAGAAGTC R: CGTTTTCAGCTAATCGTGC | 94 °C 5 min 1 ciclo | Monecke <i>et al.</i> , 2013 |
| | | 94 °C 30 seg 52 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>tst</i> (180) | F: TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT R: TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT | 94 °C 30 seg 55 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1min | Yamaguchi <i>et al.</i> , 2002 |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

Además, en las cepas de estafilococos que pertenecen al SIG se analizaron genes codificantes de leucotoxinas (*lukS/F-I*), toxinas exfoliativas (*siet*, *expA*, *expB*) y enterotoxinas (*se-int* y *sec_{canine}*) (Tabla 41).

Tabla 41. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes de virulencia en las cepas pertenecientes al SIG.

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|--|--------------------------------------|
| <i>lukF-I</i> (572 pb) | F: CCTGTCTATGCCGCTAATCAA R: AGGTCATGGAAGCTATCTCGA | 94 °C 5 min 1 ciclo | Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004a |
| <i>lukS-I</i> (332 pb) | F: TGTAAGCAGCAGAAAATGGGG R: GCCCGATAGGACTTCTTACAA | 94 °C 1 min 57 °C 1 min 35 ciclos 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>siet</i> (359 pb) | F: ATGGAATAATTTAGCGGCATCTGG R: CCATTAATTTTTCGCTTGTGTGC | 94 °C 3 min 1 ciclo 94 °C 30 seg 56 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 1 min | Lautz <i>et al.</i> , 2006 |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|---|--|--|---|
| expA (413 pb) | F: GTKTTAATTGGWAAAAATACA R: ATNCCWGAKCCTGAATTWCC | 94 °C 5 min 1 ciclo | Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2009 |
| | | 94 °C 1 min 42 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| expB (740 pb) | F: GGCATGCACATATGATGAAGCC R: CCAGATCTATCTTCTGATTGAGC | 94 °C 2 min 1 ciclo | Iyori <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 94 °C 1 min 60 °C 1 min 35 ciclos 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| se-int (147 pb) | F: GCAAGCATATCATTACATTTG R: ACTTGATATACCCTGTTTCGT | 94 °C 5 min 1 ciclo | Futagawa-Saito <i>et al.</i> , 2004b |
| | | 94 °C 1 min 55 °C 1 min 35 ciclos 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 7 min 1 ciclo | |
| sec_{canine} (425 pb) | F: GGGAAGCTITGTAATITTTGATATTCGCACT R: CCCGGATCCTATCAAATCGGATTAACA | 97 °C 5 min 1 ciclo | Edwards <i>et al.</i> , 1997 |
| | | 92 °C 30 seg 40 °C 1 min 45 ciclos 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 5 min 1 ciclo | |

El estudio de la presencia del IEC se llevó a cabo mediante PCR en todas las cepas de *Staphylococcus* spp. (Tabla 42). El gen *scn* es el marcador de la presencia del IEC, por lo que con un resultado positivo para *scn* se procedió a determinar el tipo IEC de cada cepa. En el caso de los aislados *S. aureus*, se estudió la presencia de todos los genes que componen el IEC, independientemente de un resultado positivo o negativo para *scn*. En la Tabla 42 aparecen los cebadores utilizados para analizar el IEC.

Tabla 42. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de los genes del IEC.

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| scn (257 pb) | F: AGCACAAGCTTGCCAACATCG R: TTAATATTTACTTTTTAGTGC | | |
| chp (366 pb) | F: TTTACTTTTGAACCGTTTCCTAC R: CGTCCTGAATTCTTAGTATGCATATTCATTAG | 95 °C 3 min 1 ciclo | |
| | | | |
| sak (223 pb) | F: AAGGCGATGACGCGAGTTAT R: GCGCTTGATCTAATTC AAC | 94 °C 30 seg 53 °C 30 seg 30 ciclos 72 °C 2 min | Van Wamel <i>et al.</i> , 2006 |
| | | | |
| | | 72 °C 6 min 1 ciclo | |
| sea (344 pb) | F: AGATCATTCTGTTGATAACG R: TTAACCGAAGTTCTGTAGA | | |
| sep (196 pb) | F: AATCATAACCAACCGAATCA R: TCATAATGGAAGTGCTATAA | | |

En función de la combinación de genes del IEC detectados, las cepas se clasificaron en los diferentes tipos descritos previamente (**Figura 16**) (Van Wamel *et al.*, 2006).

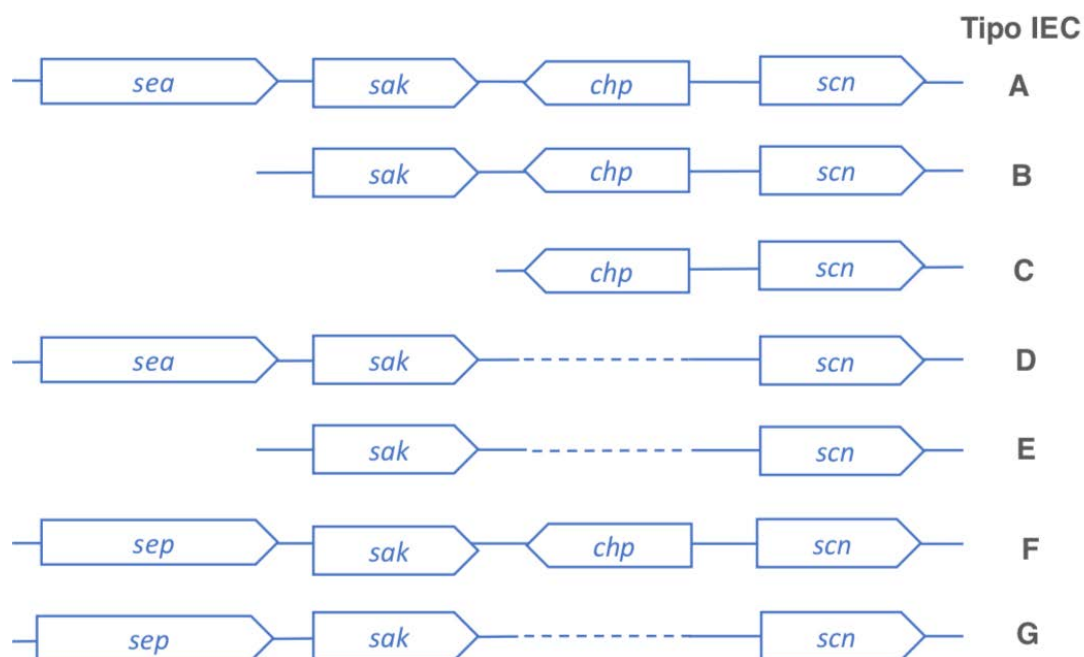


Figura 16. Combinación de genes de cada tipo IEC descrito.

En las cepas *Staphylococcus* spp. también se estudió la presencia de la variante del gen *scn* adaptada a equinos (*scneq*) (**Tabla 43**).

Tabla 43. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *scneq*.

| Gen (tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|---------------------------------|--|-----------------------|----------------------------|
| <i>scneq</i> (pb) | F: GCTGCTTTTGCTTTGTATCC R: TGCAGGAGTTTTAGTTGCAGTTTT | 94 °C 3 min 1 ciclo | Mama <i>et al.</i> , 2019a |
| | | 94 °C 1 min | |
| | | 61 °C 2 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 3 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

10. Estudio del contenido en bacteriófagos

En los aislados *Staphylococcus* spp. portadores de los factores de virulencia *lukS/I-F-PV*, *eta* y el sistema IEC, se estudió mediante PCR la presencia de integrasas de cinco familias de fagos seleccionadas (**Tabla 44**).

Tabla 44. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de integrasas de cinco familias de bacteriófagos.

| Gen (Tamaño del amplicón) | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------------------|---|---|-----------------------------|
| Sa1int (569 pb) | F: AGCACAAAGCTTGCCAAACATCG R: TTAATATTTACTTTTTAGTGC | | |
| Sa2int (640 pb) | F: TTTACTTTTGAACCGTTTCCTAC R: CGTCCTGAATTCTTAGTATGCATATTCATTAG | 95 °C 15 min 1 ciclo | |
| Sa3int (475 pb) | F: AAGGCGATGACGCGAGTTAT R: GCGCTTGGATCTAATTCAAC | 95 °C 30 seg 55 °C 1 min 35 ciclos 72 °C 45 seg | Goerke <i>et al.</i> , 2009 |
| Sa5int (375 pb) | F: AGATCATTTCGTGGTATAACG R: TTAACCGAAGTTCTGTAGA | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| Sa7int (214 pb) | F: AATCATAACCAACCGAATCA R: TCATAATGGAAGTGCTATAA | | |

11. Caracterización de entornos genéticos

Se estudió el entorno genético de diferentes genes de resistencia de interés, mediante mapeo por PCR. Para ello, se utilizaron cebadores para amplificar fragmentos de ADN solapados, que al secuenciarlos, pudiéramos conocer la estructura del entorno genético del gen de resistencia.

Entorno genético de gen *poxA*

Basándonos en la secuencia de del entorno genético de *poxA* en la cepa *E. faecium* P36 (GenBank KP834591), se diseñaron cebadores para determinar el entorno genético de este gen (Tabla 45).

Tabla 45. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *poxA*.

| Cebador | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| poxA-F | TCAATGCAGAGCAGGAAGCA | | Este estudio |
| poxA-R | GGTGGATTTACCGACACCGT | | |
| poxA-inv | ACGGTGTCCGTAATCCACC | 94 °C 7 min 1 ciclo | Este estudio |
| poxA-reg1 | GCTGCAACCCCTCATGCTA | | |
| poxA-reg2 | AGGTTTGTAAGGTTTGGGTCCT | 94 °C 1 min | |
| poxA-reg3 | TAAACGTCGGCAAACGCAAG | 60 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min | |
| poxA-reg4 | TAATCCCTTGCGTTTGCCGA | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| poxA-reg5 | AGGCAACACCACTTACGACC | | |
| fexB-F | GCAATTCCTTTTATGGACGTT | | H. Liu <i>et al.</i> , 2012 |
| fexB-R | TTCCCACTATTGGTGAAAGGAT | | |

Entorno genético del gen *optrA*

Se estudió la presencia del clúster *optrA-fexA* basándonos en la secuencia del plásmido pE394 de la cepa *E. faecalis* E394 (GenBank KP399637) (Tabla 46).

Tabla 46. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *optrA*.

| Cebador | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|------------------|------------------------------------|---|--------------|
| <i>optrA-inv</i> | TTAGTTGCTGACACCT | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>fexA-inv</i> | GACGCTATGTCCTACTCAGATGCG | 94 °C 1 min 60 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min 72 °C 10 min 1 ciclo | Este estudio |

Entorno genético del gen *cfr*

La localización del gen *cfr* en variantes del transposón Tn558 descritas en los plásmidos pSCFS3 (GenBank AM086211) y pSCFS7 (GenBank and FR675942), se estudió utilizando los cebadores que aparecen en la Tabla 47 y Tabla 48.

Tabla 47. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *cfr* en la variante del Tn558 descrita en el plásmido pSCFS7.

| Cebador | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------------|------------------------------------|---|------------------------------|
| <i>cfrinv-F</i> | TGACTCCCAACCTGCTTTATACTTCA | | |
| <i>cfrinv-R</i> | GCTGTTGTGGTCAATTATATGGT | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>fexAinv-R</i> | GACGCTATGTCCTACTCAGATGCG | 94 °C 1 min 55 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min | Lozano <i>et al.</i> , 2012d |
| <i>pSCFS7-F</i> | GTACTGTAAGTGGACGAATATCTAC | | |
| <i>tnpB-2-F</i> | GGAACAGTGATAAGCCGGATGAT | | |
| <i>tnpB-2-R</i> | GAAGGTGTATCCTTCCAGTCATATC | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>cfr-ent-1-F</i> | CTGTCAATTTCTCAAACAG | | |
| <i>cfr-ent-1-R</i> | ATTAATACGTCCTCTGAACG | | |

Tabla 48. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *cfr* en la variante del Tn558 descrita en el plásmido pSCFS3.

| Cebador | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|-----------------|------------------------------------|---|--------------|
| <i>istAS-F</i> | GAGATTGTGGAAAGGCTCAAGG | | |
| <i>istAS-R</i> | TGTTCAAGCACTCCTTCATCGAC | 94 °C 7 min 1 ciclo | |
| <i>istBS-F</i> | GAATTACGTCTTCTGGCATCC | 94 °C 1 min 60 °C 1 min 30 ciclos 72 °C 2 min | Este estudio |
| <i>istBS-R</i> | GTAAGATGGCCGATCATATTCA | | |
| <i>pSCFS3-F</i> | GGTGGTGGAAAGATGAAGGTTTCAAG | 72 °C 10 min 1 ciclo | |
| <i>pSCFS3-R</i> | GTGAAGACCGCCAGTGAATAGGAC | | |

Para completar y recircularizar un plásmido portador del gen *cfr*, se diseñaron los cebadores que aparecen en la **Tabla 49** basándonos en la secuencia del plásmido p12-02300 de *S. epidermidis* 12-02300 (GenBank KM521837).

Tabla 49. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *cfr* en el plásmido p12-02300 de *S. epidermidis* 12-02300.

| Cebador | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|--------------|
| cfr_ent-F | CCTTGTAAGTTGTGAAACAAACACA | 94 °C 7 min 1 ciclo | Este estudio |
| | | 94 °C 1 min | |
| cfr_ent-R | AGTCTAAATGGCTTTCATCTGCTTT | 60 °C 2 min 30 ciclos | Este estudio |
| | | 72 °C 3 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

Entorno genético del gen *dfrK*

Se estudió la localización del gen *dfrK* en el transposón Tn559 descrito en *S. aureus* (Genbank FN677369) y su integración en el gen cromosómico *radC* se estudió utilizando los cebadores que aparecen en la **Tabla 50**.

Tabla 50. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del entorno genético del gen *dfrK* en el transposón Tn559.

| Cebador | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|--------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| dfrK-F | TCAATGCAGAGCAGGAAGCA | 95 °C 3 min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010 |
| dfrK-rv | CAAGAAGCTTTTCGCTCATAAA | | |
| tnpA-F | GCCACTTGGGACAATCAAAT | 95 °C 1 min | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2014 |
| tnpA-R | CAACATCCCATCCTTCCCTA | | |
| tnpB-F | AAATCGTTGGGTTCTGTTTTG | 55 °C 1 min 30 ciclos | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2014 |
| tnpB-R | AAAGCGAGTTTTGCTCTTG | | |
| tnpC-F | GGCGAAGCAGAAATCACAA | 72 °C 10 min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2014 |
| tnpC-R | AAGGATTTCTCCGAACGAG | | |
| radC_SA-F | CGGTGAGAGAAAATGCCAAT | 72 °C 10 min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2013a |
| radC_SA-R | TCAAACCACACTCCTTCAACC | | |
| radC_SP-F | GTTTGTGGAATAGGGCGTA | 94 °C 1min 1 ciclo | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2013a |
| | | 98 °C 10 seg | |
| radC_SP-R | ACGATTCTTCCCCAATCACA | 68 °C 15 min 30 ciclos | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2013a |
| | | 72 °C 2 min | |
| Tn559_circ-F | TCCATGAACTCGTACAGCAA | 72 °C 10 min 1 ciclo | Kadlec y Schwarz, 2010 |
| Tn559_circ-R | TGGTTGTGAAATTGTCCATTC | 95 °C 3 min 1 ciclo | |
| | | 95 °C 1 min | |
| | | 55 °C 1 min 30 ciclos | |
| | | 72 °C 1 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

También se investigó la presencia del clúster *tet(L)-dfrK* en las cepas de *Staphylococcus* spp., basándonos en la secuencia del plásmido pKKS2187 (GenBank FM207105) (Tabla 51).

Tabla 51. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR utilizadas para el estudio del clúster *tet(L)-dfrK*.

| Primer | Secuencia de los cebadores (5'→3') | Condiciones | Referencia |
|----------|------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| tet(L)-F | CATTGGTCTTATTGGATCG | 94 °C 7 min 1 ciclo | Aarestrup <i>et al.</i> , 2000 |
| | | 94 °C 1 min | |
| dfrK-R | CAAGAAGCTTTTCGCTCATAAA | 55 °C 1 min 30 ciclos | Gómez-Sanz <i>et al.</i> , 2010 |
| | | 72 °C 2 min | |
| | | 72 °C 10 min 1 ciclo | |

12. Transferencia génica

Para determinar la transferencia de los genes de resistencia a linezolid, se utilizaron las técnicas de conjugación y transformación.

12.1. Conjugación

Se usaron diferentes cepas receptoras para la conjugación, en función de la especie dadora:

- **Mutante *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a rifampicina:** Se sembró la cepa *S. aureus* ATCC® 29213 en placas de BHI agar con rifampicina (50 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante 24-48 horas. Los mutantes obtenidos se conservaron a -80 °C en leche descremada (Difco™) para su posterior utilización. La cepa *S. aureus* ATCC® 29213 pertenece al tipo *spa* t021.
- ***E. faecalis* JH2-2:** Cepa resistente a ácido fusídico y rifampicina que pertenece a la secuencia tipo ST8.

Se utilizó el método de la conjugación en filtro (Shore *et al.*, 2010). Se sembró la cepa dadora y la cepa receptora en 5 mL de BHI caldo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en agitación. Se mezclaron en un tubo eppendorf estéril 100 µL del cultivo de cepa receptora con 10 µL de cultivo de cepa dadora y la mezcla se colocó en un filtro Millipore de 0,45 µm (Millex®) sobre placas de BHI agar, que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se resuspendió el crecimiento producido sobre el filtro en 1 mL de BHI caldo y se vorteoó. Se sembraron 100µL de las diluciones 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶ en:

- Placas control de BHI para seleccionar la cepa receptora con:
 - o Rifampicina (50 µg/mL) para el mutante *S. aureus* ATCC® 29213 resistente a rifampicina.
 - o Rifampicina (100 µg/mL) y ácido fusídico (25 µg/mL) para la cepa *E. faecalis* JH2-2.
- Placas control de BHI para seleccionar la cepa dadora con:
 - o Florfenicol (10 µg/mL) cuando se quiso transferir los genes *optrA* y *poxxA*.
 - o Linezolid (4 µg/mL) cuando se quiso transferir el gen *cfp*
- Placas para seleccionar los posibles transconjugantes con la combinación de antibióticos según la cepa receptora y el gen que se quiso transferir.

12.2. Transformación mediante electroporación

En las cepas *E. faecalis* y *E. faecium* también se estudió la transferibilidad de los genes de resistencia a linezolid mediante ensayos de transformación por electroporación (Friesenegger *et al.*, 1991), usando como cepa receptora *E. faecalis* JH2-2 o *E. faecium* GE-1, en función de la cepa dadora. El ADN plasmídico utilizado para la transformación se extrajo como aparece en el punto 3.2. El método que se siguió fue en siguiente:

- **Obtención de las células electrocompetentes:**
 - o Se creció la cepa receptora en 250 mL de TH (*Todd-Hewitt*; Difco®) caldo durante 24h a 37 °C en agitación.
 - o Se centrifugó el cultivo durante 15 minutos a 10000 r.p.m..
 - o Se lavaron las células con 250, 125 y 5 mL de glicerol 10%.
 - o Se resuspendieron las células en 500 µL de glicerol 10% y se guardaron en alícuotas de 100 µL a -80 °C para su uso posterior.
- **Electroporación:** Se descongelaron las células electrocompetentes en hielo. Se mezclaron 50 µL de la cepa receptora con 1 µL de ADN plasmídico (hasta 200 ng) y se transfirió la mezcla a cubetas de electroporación congeladas de 1mm. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 12500 V/cm, 400 Ω, constante de tiempo 9-16 ms. Se añadió 1 mL de TH caldo en la cubeta y se pasó la mezcla a tubos estériles que se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación. Se sembraron varias alícuotas en TH agar con florfenicol (10 µg/mL), que se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

12.3. Identificación de los transconjugantes y transformantes

La identificación de posibles transconjugantes y transformantes realizó mediante MALDI-TOF. Además, se utilizó la técnica del tipado del gen *spa*, en el caso de *Staphylococcus* spp., o del tipado por MLST para *Enterococcus* spp. para corroborar que se trataba de la cepa receptora.

Posteriormente, se extrajo el ADN y, mediante PCR, se estudió la presencia de los genes que se quisieron transferir. Se analizaron los cambios en la sensibilidad a antibióticos en las cepas transconjugantes con respecto a la cepa receptora mediante la técnica de difusión en disco y por la técnica microdilución.

13. Secuenciación

Se utilizó la técnica de secuenciación de los productos de PCR para el tipado *spa* y MLST, confirmar la presencia de determinados genes de resistencia y virulencia, para la detección de mutaciones y para estudiar los entornos genéticos de genes de resistencia. La secuenciación la llevó a cabo la empresa Genewiz (Leipzig, Alemania), la cual utiliza el método Sanger con el sistema automático ABI 3730xl DNA Analyzers.

Para el análisis de las secuencias obtenidas se emplearon diferentes herramientas informáticas:

- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): Compara de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) Transeq: Traduce las secuencias de nucleótidos a secuencias aminoacídicas. https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/
- EMBOSS Needle: Alinea dos secuencias de nucleótidos o de proteínas https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/
- MLST: Compara los alelos obtenidos con los alelos previamente descritos y asigna una secuencia tipo en función de la combinación alélica. <https://pubmlst.org>
- Ridom® Staph-Type versión 2.2.1 (Ridom GmbH): Analiza a región polimórfica del gen *spa* y asigna el *spa*-tipo correspondiente.

14. Secuenciación completa del genoma (WGS)

Para determinar el entorno genético de genes de resistencia de interés, se realizó la secuenciación del genoma completo de 19 cepas de estafilococos o enterococos.

14.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit “QIAamp® DNA Stool Mini Kit” (Qiagen), con algunas modificaciones según si se trataba de bacterias del género *Staphylococcus* o *Enterococcus*.

Staphylococcus

1. Se partió de un cultivo bacteriano crecido durante 24 horas a 37 °C en 5 mL de BHI líquido suplementado con antibiótico.
2. Se centrifugó durante 10 minutos a 7500 r.p.m. y se desechó el sobrenadante.
3. Se añadió 25 µL de lisostafina (0,1 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 25 minutos.
4. Se añadió 75 µL de buffer TE y 25 µL de proteinasa K (0,1 mg/L) y se incubó durante 25 minutos a 37 °C.
5. Se añadió 75 µL de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y 2 µL de ARNasa (2 µg/µL) y se mezcló ligeramente.
6. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Se añadió 200 µl del Buffer-AL y se vorteoó.
8. Se incubó durante 1 hora a 56 °C y se dio un centrifugado rápido.
9. Se añadió 200 µl de etanol (96-100%) y se centrifugó brevemente para eliminar las posibles gotas de la tapa del tubo eppendorf.
10. Se transfirió toda la mezcla, incluido el precipitado, a tubos eppendorf con columna y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 r.p.m.
11. Se eliminó el filtrado y se añadió 500 µL del Buffer-AW1.
12. Se centrifugó durante 1 minuto a 8000 r.p.m. y se eliminó el filtrado.
13. Se añadió 500 µL del Buffer-AW2 y se centrifugó durante 3 minutos a 14 000 r.p.m.
14. Se eliminó el filtrado y se centrifugó durante 1 minuto a 14 000 r.p.m.
15. Se cambiaron las columnas a unos eppendorf nuevos.

16. Se añadió 20 µL de agua MiliQ, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 1 minuto. Se repitió este paso una vez más.
17. Se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% durante 80 minutos a 90 V.

Enterococcus

1. Se partió de un cultivo bacteriano crecido durante 24 horas a 37 °C en 5 ml de BHI líquido suplementado con antibiótico.
2. Se centrifugó durante 10 minutos a 7500 r.p.m. y se desechó el sobrenadante.
3. Se resuspendió el precipitado en una disolución enzimática (20 mg/mL lisozima; Tris-HCl 20 mM, pH 8; EDTA 2 mM; Triton 1,2%).
4. Se vortexó y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
5. Se añadió 20 µl de Proteinasa K (0,1 mg/L) y 1 µl de ARNasa (2 µg/µL).
6. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos.

A partir del paso 7, se continuó con la extracción de ADN como aparece en el apartado de estafilococos.

14.2. Secuenciación

Se generaron las librerías para secuenciación masiva del genoma utilizando el kit “Nextera XT library preparation kit” (Illumina® Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en un equipo “Illumina MiSeq platform” (Illumina® Inc.) utilizando el protocolo 2x300 *paired-end*.

14.3. Análisis de las secuencias

Las secuencias genómicas fueron ensambladas *de novo* utilizando es software MIRA 4.0 (Biomatters) y anotadas mediante RAST (Aziz *et al.*, 2008). Las secuencias nucleotídicas se analizaron con Geneious v 2019.0.4 (Biomatters), y con las herramientas Resfinder 3.2 (Zankari *et al.*, 2012), VirulenceFinder 2.0 (Joensen *et al.*, 2014), MLST 2.0 (Larsen *et al.*, 2012) y PlasmidFinder 2.1 (Carattoli *et al.*, 2014) del sitio web “Center for Genomic Epidemiology” (<http://www.genomicepidemiology.org>). También se investigó la presencia de secuencias de inserción mediante ISfinder (Siguier *et al.*, 2006). Los alineamientos nucleotídicos se realizaron usando Geneious, con los parámetros predeterminados y los aminoácidos con la matriz BLOSUM62. La representación gráfica de los alineamientos se realizó con el programa EasyFig 2.2.2.

14.4. Relación filogenética

Se utilizó la herramienta CSI Phylogeny 1.4 (Kaas *et al.*, 2014) con los parámetros predeterminados para realizar el análisis filogenético basada en la alineación concatenada de polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs). Se construyó el árbol siguiendo el método de la máxima verosimilitud utilizando FastTree 2.1.7 (Price *et al.*, 2010).

15. Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba exacta de Fisher o la prueba de Chi-cuadrado de Pearson, en función del tamaño de la muestra, para estudiar las diferencias entre conjuntos de datos utilizando la herramienta RStudio® 1.3. (PBC). Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados



1. Prevalencia, diversidad de especies, resistencia a antibióticos y líneas genéticas de *Staphylococcus* spp. de diversos orígenes

1.1. *Staphylococcus* spp. de muestras traqueales de aves silvestres

En primer lugar, se analizó la presencia y diversidad de *Staphylococcus* spp., tanto SCoP como SCoN, en 242 muestras traqueales de aves silvestres de diferentes especies y localizaciones geográficas.

Se detectaron SCoP en 20 de las 242 muestras de aves estudiadas (8,3%), que correspondían a buitre negro (n=16), urraca (n=3) y milano (n=1). En total se obtuvieron 21 aislados SCoP, una cepa por animal y una muestra con dos cepas (**Tabla 52**). Estas cepas fueron identificadas como *S. aureus* (n=9) y *S. delphini* (n=12). Se detectó *S. aureus* en nueve de los 242 animales analizados (3,7%): seis buitres negros y tres urracas. Por su parte, *S. delphini* estaba presente en 12 muestras (5%), que pertenecían a buitre negro (n=11) y milano (n=1) (**Tabla 52**).

Tabla 52. Especies de aves silvestres donde fueron aisladas las cepas SCoP.

| Origen | Número de animales muestreados | Número de animales portadores de (%): | | |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------------------|
| | | SCoP | <i>S. aureus</i> | <i>S. delphini</i> |
| Buitre negro | 98 | 16 (16) ^a | 6 (6) | 11 (11) |
| Urraca | 59 | 3 (5) | 3 (5) | - |
| Milano real | 38 | 1 (3) | - | 1 (2) |
| Otras especies | 47 ^b | - | - | - |

^a Un buitre negro era portador de una cepa *S. aureus* y de una cepa *S. delphini*.

^b Ibis eremita, 27; quebrantahuesos, 9; gaviota reidora, 6; alimoche, 2; abejero europeo, 2; y aguilucho lagunero, 1.

Entre las nueve cepas *S. aureus* detectadas en las muestras de aves, ocho de ellas eran SARM (3,7% de los animales analizados) y una SASM (**Tabla 53**). Una de las cepas SARM era portadora del gen *mecA* y fue tipada como t011-ST398/CC398-*agrI*-SCC*mecV*. Presentó resistencia a penicilina, cefoxitina, eritromicina, clindamicina (resistencia constitutiva) y tetraciclina, y albergaba los genes de resistencia *blaZ*, *erm(C)*, *vga(A)*, *tet(K)* y *tet(M)* (**Tabla 53**). Los siete aislados SARM restantes eran *mecC* positivos y entre ellos se identificaron los tipos *spa* t843 (n=7) y t1535 (n=1), asociados en todos los casos a la secuencia tipo ST1945 y al complejo clonal CC130. Los aislados *mecC* positivos fueron sensibles a todos los antibióticos no β -lactámicos estudiados y contenían el *agr*-III y SCC*mec*-XI (**Tabla 53**). Se identificó el alotipo del gen *blaZ* específico del SCC*mec* tipo XI en todas las cepas portadoras del gen *mecC*. La cepa SASM, tipada como t267-ST97/CC97-*agrI*, fue sensible a todos los antibióticos estudiados y se aisló de una muestra de buitre negro.

Tabla 53. Caracterización de las nueve cepas *S. aureus* aisladas de aves silvestres.

| Cepa | Origen | Tipado molecular | | | | Resistencia a antibióticos | |
|-------|--------------|------------------|--------------|------------|--------|----------------------------|---|
| | | <i>spa</i> -tipo | MLST/CC | <i>agr</i> | SCCmec | Fenotipo | Genotipo |
| C9241 | Buitre negro | t011 | ST398/CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> |
| C9460 | Buitre negro | t843 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9228 | Buitre negro | t843 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9162 | Urraca | t843 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9165 | Urraca | t843 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9169 | Urraca | t843 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9257 | Buitre negro | t843 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9456 | Buitre negro | t1535 | ST1945/CC130 | III | XI | PEN-FOX | <i>mecC</i> , <i>blaZ</i> -SCCmecXI |
| C9461 | Buitre negro | t267 | ST97/CC97 | I | - | Sensible | - |

De los 12 aislados *S. delphini*, 11 de ellos se clasificaron en el grupo B y el restante en el grupo A (Tabla 54). Todas las cepas *S. delphini* fueron sensibles a meticilina y presentaron resistencia a los siguientes antibióticos (número de cepas resistentes/genes de resistencia detectados): penicilina [7/*blaZ*], clindamicina [4/*Inu(A)*], estreptomina [3/*str*], tetraciclina [9/*tet(K)* y/o *tet(L)*] y cloranfenicol [1/*fexA*]. La resistencia a clindamicina fue constitutiva en todas las cepas *S. delphini*.

Tabla 54. Características de las 12 cepas *S. delphini* aisladas de aves silvestres.

| Cepa | Origen | Grupo <i>S. delphini</i> | Resistencia a antibióticos | |
|-------|--------------|--------------------------|----------------------------|--|
| | | | Fenotipo | Genotipo |
| C9221 | Buitre negro | B | PEN, STR, TET, CLO | <i>blaZ</i> , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> , <i>fexA</i> |
| C9242 | Buitre negro | B | PEN, CLI, STR, TET | <i>blaZ</i> , <i>Inu(A)</i> , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> |
| C9253 | Buitre negro | B | PEN, TET | <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> |
| C9458 | Buitre negro | B | PEN, TET | <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> |
| C9459 | Buitre negro | B | PEN, TET | <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> |
| C9247 | Buitre negro | B | PEN, CLI | <i>blaZ</i> , <i>Inu(A)</i> |
| C9457 | Buitre negro | B | PEN, CLI | <i>blaZ</i> , <i>Inu(A)</i> |
| C9455 | Buitre negro | B | STR, TET | <i>str</i> , <i>tet(K)</i> |
| C9237 | Buitre negro | B | TET | <i>tet(K)</i> |

| Cepa | Origen | Grupo <i>S. delphini</i> | Resistencia a antibióticos | |
|-------|--------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | | Fenotipo | Genotipo |
| C9243 | Buitre negro | A | TET | <i>tet(K), tet(L)</i> |
| C9261 | Buitre negro | B | TET | <i>tet(K)</i> |
| C9178 | Milano real | B | CLI | <i>Inu(A)</i> |

Respecto a los SCoN, 146 de las 242 aves analizadas (60,3%) portaban al menos una especie de SCoN (**Tabla 55**). De los 146 animales positivos, 120 estaban colonizados solo por una única especie de SCoN. La colonización por dos especies diferentes se detectó en 24 de los animales analizados, y la colonización por tres y cuatro especies diferentes, en un animal cada uno. Se detectaron los siguientes patrones de colonización mixta (número de aves/especie): *S. sciuri/S. lentus* (12/milano real), *S. sciuri/S. fleurettii* (5/buitre negro), *S. sciuri/S. xylosus* (2/buitre negro), *S. sciuri/S. kloosii* (2/buitre negro y abejero europeo), *S. epidermidis/S. capitis* (1/urraca), *S. sciuri/S. epidermidis* (1/ ibis eremita), *S. saprophyticus/S. kloosii* (1/abejero europeo), *S. sciuri/S. fleurettii/S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (1/quebrantahuesos), *S. sciuri/S. lentus/S. vitulinus/S. xylosus* (1/ aguilucho lagunero).

Se aislaron un total de 173 cepas de SCoN y los resultados del MALDI-TOF revelaron la presencia de 11 especies diferentes (número de cepas detectadas/porcentaje respecto al total de aislados) (**Tabla 55**): *S. sciuri* (118/68,2), *S. lentus* (25/14,5), *S. fleurettii* (7/4), *S. vitulinus* (6/3,5), *S. epidermidis* (4/2,3), *S. kloosii* (3/1,7), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* 3/1,7), *S. xylosus*)3/1,7), *S. saprophyticus* (2/1,2), *S. succinus* (1/0,6) y *S. capitis* (1/0,6).

Aunque la especie *S. sciuri* fue identificada en todas las especies de aves, los análisis estadísticos revelaron que se detectó más frecuentemente entre los animales carroñeros estrictos y facultativos (Pearson's $\chi^2=11,34$; D.f.=1; $p=0,001$). Además, la especie *S. lentus* fue detectada únicamente en los animales carroñeros estrictos y facultativos y en el aguilucho lagunero que fue capturado en el comedero de buitres. Los milanos reales que fueron estudiados en febrero de 2016 en el muladar (habían pasado la invernada antes de iniciar la migración al norte) estuvieron colonizados más frecuentemente por *S. lentus* que los estudiados en noviembre de 2015 (a su llegada al muladar, en su viaje de migración al Sur) (Pearson's $\chi^2=6,89$; D.f.=1; $p=0,0087$).

La **Figura 17** muestra las tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las 173 cepas de SCoN aisladas de las aves. La única cepa que fue sensible a todos los antibióticos estudiados fue el aislado *S. capitis*. Se detectaron 58 cepas (34%) multiresistentes: *S. sciuri* (n=21), *S. lentus* (n=20), *S. fleurettii* (n=6), *S. epidermidis* (n=4), *S. schleiferi* (n=3), *S. xylosus* (n=2), *S. kloosii* (n=1) y *S. vitulinus* (n=1).

La **Tabla 56** resume los fenotipos y genotipos de resistencia detectados entre las cepas SCoN, mientras que las características específicas de cada cepa se pueden encontrar en el **Anexo I**. Se identificaron 42 SCoNRM (24%) que pertenecían a las especies *S. sciuri* (n=28), *S. lentus* (n=5), *S. fleurettii* (n=5), *S. vitulinus* (n=2) y *S. epidermidis* (n=2).

Tabla 55. Diversidad de aislados de SCoN en función de la especie animal analizada.

| Especie animal | Número de animales muestreados | Número de animales colonizados por SCoN (%) | Número de cepas aisladas | Número de cepas por especie (%): | | | | | |
|--------------------|--------------------------------|---|--------------------------|----------------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| | | | | <i>S. sciuri</i> | <i>S. lentus</i> | <i>S. fleurettii</i> | <i>S. vitulinus</i> | <i>S. epidermidis</i> | Otras especies de SCoN ^a |
| Buitre negro | 98 | 67 (68) | 73 | 55 | 6 | 6 | 1 | - | 5 |
| Urraca | 59 | 23 (39) | 24 | 16 | - | - | 4 | 2 | 2 |
| Milano real | 38 | 30 (79) | 42 | 25 | 17 | - | - | - | - |
| Ibis eremita | 27 | 11 (41) | 12 | 11 | - | - | - | 1 | - |
| Quebratahuesos | 9 | 5 (56) | 7 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | 2 |
| Gaviota reidora | 6 | 5 (83) | 5 | 5 | - | - | - | - | - |
| Alimoche | 2 | 2 (100) | 2 | 2 | - | - | - | - | - |
| Abejero europeo | 2 | 2 (100) | 4 | 1 | - | - | - | - | 3 |
| Aguilucho lagunero | 1 | 1 (100) | 4 | 1 | 1 | . | 1 | - | 1 |
| Total | 242 | 146 (60) | 173 | 118 | 25 | 7 | 6 | 4 | 13 |

^aIncluye las especies *S. xylosus*, *S. kloosii*, *S. schleiferi*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* y *S. capitis*.

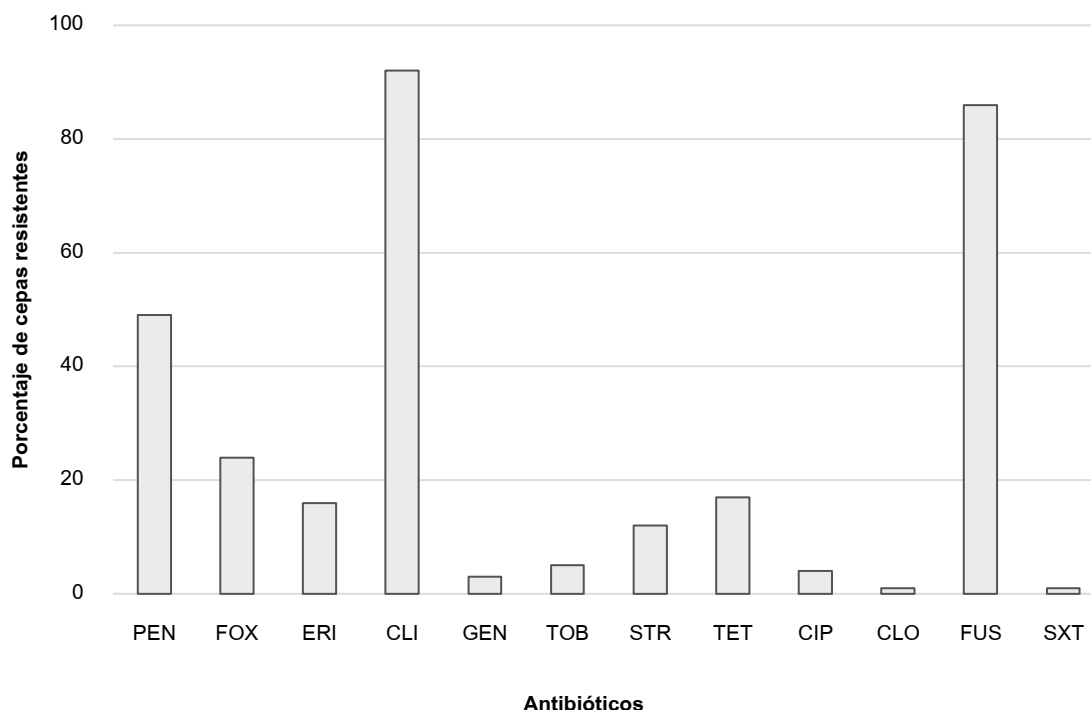


Figura 17. Tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las cepas SCoN aisladas de aves silvestres.

Además, cinco aislados identificados como *S. sciuri* o *S. fleurettii* eran portadores del gen *mecA*, pero no mostraron un fenotipo de resistencia a meticilina (Tabla 56). Se detectaron 85 cepas con resistencia a penicilina, que estuvo mediada por los genes *mecA* y/o *blaZ* en 59 de ellas. Sin embargo, el mecanismo de resistencia a penicilina no se pudo identificar en el resto de las cepas. En las cepas que mostraron resistencia a macrólidos y/o lincosamidas se identificaron diferentes combinaciones de los genes *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(43)*, *msr(A)*, *mph(C)*, *Inu(A)*, *Isa(B)*, *vga(A)* y *sal(A)*. El gen *sal(A)* se encontró únicamente en la especie *S. sciuri*. La resistencia a clindamicina fue constitutiva, excepto en una cepa *S. lentus* que presentó resistencia inducible. Se detectaron los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(4'')-Ia* y/o *str* entre las cepas resistentes a aminoglucósidos. La resistencia a tetraciclina, que fue especialmente alta entre las cepas de la especie *S. lentus* (60%), estuvo mediada por los genes *tet(K)*, *tet(L)* y/o *tet(M)*. Se detectaron cambios aminoacídicos en las proteínas GyrA (S84L) y GrlA (D84E y M89L) en los cinco aislados *S. lentus* resistentes a fluoroquinolonas. Además, una cepa *S. sciuri* y otra cepa *S. xylosus* presentaron resistencia a ciprofloxacino, pero no se detectó ningún cambio aminoacídico en las QRDRs. Se identificó el gen *fexA* en las dos cepas *S. sciuri* que presentaron resistencia a cloranfenicol. Aunque solo uno de los dos aislados *S. saprophyticus* fue resistente a ácido fusídico, ambas cepas portaban en gel *fusD*, el cual es específico de esta especie y le confiere resistencia intrínseca. El mecanismo de resistencia a ácido fusídico en las cepas restantes, solo se identificó en un aislado *S. epidermidis* portador del gen *fusB*. El gen *dfiK* se detectó en la única cepa resistente a trimetoprim-sulfametoxazol (Tabla 56), y el análisis del entorno genético reveló que se encontraba aguas abajo del gen *tet(L)*. Todas las cepas SCoN aisladas de las muestras de aves silvestres fueron sensibles a linezolid.

Entre las 47 cepas *mecA* positivas, 10 *S. sciuri* y dos *S. lentus* portaban el SCC*mec* tipo III y una cepa *S. epidermidis* el SCC*mec* tipo IV. En el resto de las cepas no se llegó a un consenso para el tipo SCC*mec*, bien porque no se adscribieron a un tipo SCC*mec* conocido, o porque no fueron tipables con los cebadores utilizados (**Anexo I**).

Tabla 56. Fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos de las 173 cepas SCoN aisladas de aves silvestres.

| Especie | Número de cepas | Resistencia a antibióticos ^a | |
|---|-----------------|---|--|
| | | Fenotipo | Genotipo |
| <i>S. sciuri</i> | 118 | PEN ⁵⁶ -FOX ²⁸ -ERI ¹¹ -CLI-GEN ³ -TOB ⁶ -STR ⁹ -TET ⁸ -CIP ¹ -CLO ² -FUS ¹⁰⁸ | <i>mecA</i> ³¹ , <i>blaZ</i> ⁷ , <i>erm(B)</i> ⁵ , <i>erm(C)</i> ⁸ , <i>msr(A)</i> ¹ , <i>Inu(A)</i> ²⁰ , <i>Isa(B)</i> ¹ , <i>sal(A)</i> , <i>aac(6')-le-aph(2'')-la</i> ³ , <i>ant(4')-la</i> ³ , <i>str</i> ⁹ , <i>tet(K)</i> ⁶ , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>tet(M)</i> ² , <i>foxA</i> ² |
| <i>S. lentus</i> | 25 | PEN ⁷ -FOX ⁵ -ERI ¹³ -CLI ²⁴ -TOB ¹ -STR ³ -TET ¹⁵ -CIP ⁵ -FUS ²¹ -SXT ¹ | <i>mecA</i> ⁵ , <i>blaZ</i> ³ , <i>erm(B)</i> ⁹ , <i>erm(C)</i> ⁴ , <i>erm(43)</i> ⁷ , <i>mph(C)</i> ¹⁰ , <i>Inu(A)</i> ¹² , <i>vga(A)</i> ² , <i>Isa(B)</i> ¹ , <i>ant(4')-la</i> ¹ , <i>str</i> ³ , <i>tet(K)</i> ¹¹ , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>tet(M)</i> ⁵ , <i>dfrK</i> ¹ |
| <i>S. fleurettii</i> | 7 | PEN-FOX ⁵ -CLI ⁶ -STR ³ -FUS | <i>mecA</i> , <i>Inu(A)</i> ¹ , <i>str</i> ³ |
| <i>S. vitulinus</i> | 6 | PEN ² -FOX ² -CLI ² -GEN ¹ -TOB ¹ -STR ² -FUS ⁵ | <i>mecA</i> ² , <i>aac(6')-le-aph(2'')-la</i> ¹ , <i>str</i> ² |
| <i>S. epidermidis</i> | 4 | PEN-FOX ² -ERI ³ -CLI-TET ¹ -FUS ² | <i>mecA</i> ² , <i>blaZ</i> ³ , <i>erm(C)</i> ³ , <i>mph(C)</i> ² , <i>Inu(A)</i> ³ , <i>vga(A)</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ¹ , <i>fusB</i> ¹ |
| <i>S. kloosii</i> | 3 | PEN-CLI ¹ -TET ¹ -FUS | <i>blaZ</i> , <i>Inu(A)</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ¹ |
| <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> | 3 | PEN ¹ -CLI ² -STR-TET | <i>blaZ</i> ¹ , <i>Inu(A)</i> ² , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> |
| <i>S. xylosus</i> | 3 | PEN-ERI ¹ -CLI ² -STR ¹ -TET ¹ -CIP ¹ -FUS ² | <i>blaZ</i> ¹ , <i>erm(B)</i> ¹ , <i>mph(C)</i> ¹ , <i>Inu(A)</i> ¹ , <i>str</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ¹ |
| <i>S. saprophyticus</i> | 2 | PEN ¹ -GEN ¹ -TOB ¹ -FUS ¹ | <i>blaZ</i> ¹ , <i>aac(6')-le-aph(2'')-la</i> ¹ , <i>fusD</i> |
| <i>S. capitis</i> | 1 | Sensible | - |
| <i>S. succinus</i> | 1 | PEN | <i>blaZ</i> |

^aEl superíndice indica el número de cepas cuando no todas comparten la característica indicada.

1.2. *Staphylococcus* spp. de muestras ambientales de granjas porcinas

A continuación, fue nuestro interés realizar la caracterización de estafilococos de muestras ambientales del ámbito ganadero. Por ello, se estudió una colección de *Staphylococcus* spp obtenida de muestras de aire y de purines de dos granjas de cerdos con distinto sistema de producción, una de tipo intensivo (PI) y la otra semi-extensivo (PSE), con el objetivo de caracterizar las cepas y de analizar posibles diferencias entre ellas.

De las muestras ambientales recogidas en las dos granjas porcinas, se obtuvieron un total de 35 aislados de la granja PI y 37 de la granja PSE (**Tabla 57**).

Tabla 57. Diversidad y frecuencia de especies aisladas de las muestras ambientales de la granja PI y PSE.

| Especie | Número cepas (%) | |
|-------------------------|------------------|----------------|
| | Granja PI (%) | Granja PSE (%) |
| <i>S. aureus</i> | 4 (11,4) | - |
| <i>S. arlettae</i> | 1 (2,9) | 17 (46) |
| <i>S. chromogenes</i> | - | 2 (5,4) |
| <i>S. cohnii</i> | 9 (25,7) | 3 (8,1) |
| <i>S. epidermidis</i> | 2 (5,7) | 2 (5,4) |
| <i>S. equorum</i> | 1 (2,9) | - |
| <i>S. haemolyticus</i> | 3 (8,6) | - |
| <i>S. lentus</i> | 1 (2,9) | - |
| <i>S. nepalensis</i> | 4 (11,4) | - |
| <i>S. saprophyticus</i> | 5 (14,2) | - |
| <i>S. sciuri</i> | 3 (8,5) | 6 (16,2) |
| <i>S. simulans</i> | - | 3 (8,1) |
| <i>S. succinus</i> | - | 1 (2,7) |
| <i>S. xylosus</i> | 1 (2,9) | 3 (8,1) |
| <i>S. warneri</i> | 1 (2,9) | - |
| Total | 35 | 37 |

En la **Tabla 58** aparecen las características de los 4 *S. aureus* aislados de las muestras de aire de la granja PI. Todos ellos fueron tipados como t011-ST398/CC398-*agrI*. Dos de ellos fueron SARM *mecA* positivos con el SCC*mec* tipo V, mientras que los dos restantes fueron SASM. Los cuatro aislados presentaron un fenotipo y genotipo de multiresistencia. Las cepas SARM-*mecA* fueron resistentes a fluoroquinolonas y se detectaron los cambios aminoacídicos S84L y S80F en los genes codificantes de las proteínas GyrA y GrlA, respectivamente.

Tabla 58. Caracterización genética de las cuatro cepas *S. aureus* aisladas de la granja porcina PI.

| Cepa | Tipado molecular | | | | Resistencia a antibióticos | |
|--------------|------------------|-----------------|------------|----------------|---|--|
| | <i>spa</i> -tipo | MLST/CC | <i>agr</i> | SCC <i>mec</i> | Fenotipo | Genotipo |
| C9961 | t011 | ST398/ CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^a - LEV-CLO | <i>blaZ</i> , <i>mecA</i> , <i>erm(C)</i> , <i>lsa(B)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> |
| C9962 | t011 | ST398/ CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^a - LEV | <i>blaZ</i> , <i>mecA</i> , <i>erm(C)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> |
| C9958 | t011 | ST398/ CC398 | I | - | PEN-CLI-GEN-TOB-TET-CLO- SXT | <i>blaZ</i> , <i>vga(A)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrrD</i> |
| C9959 | t011 | ST398/ CC398 | I | - | PEN-CLI-GEN-TOB-TET-CLO- SXT | <i>blaZ</i> , <i>vga(A)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrrD</i> |

^aEstas cepas mostraron los cambios aminoacídicos S84L y S80F en las proteínas GyrA y GrlA, respectivamente.

Las tasas de resistencia a antibióticos de las cepas SCoN aisladas de la granja PI y PSE se representan en la **Figura 18**. La resistencia a aminoglucósidos, tetraciclina y trimetropim-sulfametoxazol fue estadísticamente mayor entre los aislados de la granja PI respecto a la PSE. Además, solo se detectó resistencia a cefoxitina y a ciprofloxacino entre los aislados de la granja PI.

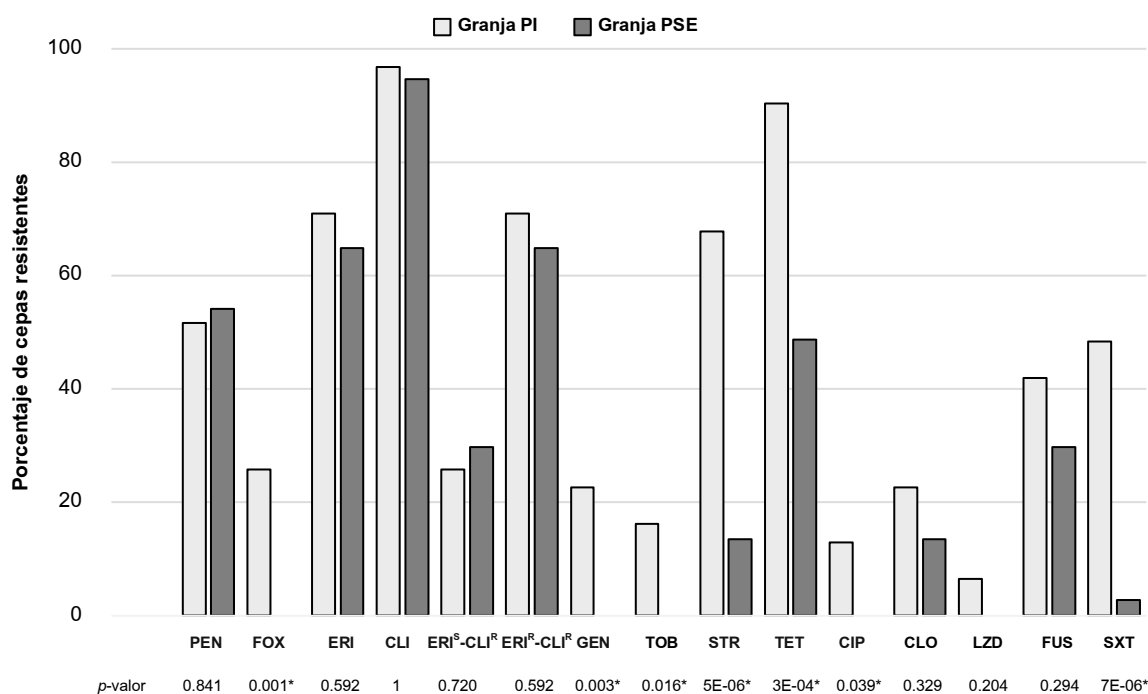


Figura 18. Tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las cepas SCoN aisladas de las granjas PI y PSE.

El p-valor (test exacto de Fisher o test de Chi-Cuadrado de Pearson) se muestra debajo de la figura. Los asteriscos indican los antibióticos para los que se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

La **Tabla 59** muestra los fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos por especies entre los aislados SCoN, mientras que la caracterización específica de cada aislado se encuentra en el **Anexo II**. Solo una cepa identificada como *S. chromogenes* presentó sensibilidad a todos los antibióticos analizados y 59 de los 68 SCoN (80%) fueron multiresistentes. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número de cepas multiresistentes de las dos granjas estudiadas.

Todas las cepas *S. arlettae* albergaban el gen bla_{ARL} , el cual codifica una β -lactamasa que es específica de esta especie. Un aislado *S. cohnii* mostró resistencia a penicilina, pero no se detectaron los genes *bla_Z*, *mecA*, *mecB* o *mecC*. Ocho cepas, todas ellas aisladas de la granja PI (5 *S. saprophyticus*, 1 *S. haemolyticus*, 1 *S. equorum*, y 1 *S. sciuri*), mostraron resistencia a meticilina, mediada por el gen *mecA*. Además, dos aislados *S. sciuri* también portaban el gen *mecA*, a pesar de no mostrar un fenotipo de resistencia a meticilina; no obstante, la parte del gen *mecA* que fue secuenciada presentó una identidad nucleotídica y aminoacídica del 100% respecto a la secuencia de referencia *S. aureus* MRSA252 (GenBank BX571856). Numerosos aislados presentaron resistencia a eritromicina y clindamicina (resistencia constitutiva) mediada por combinaciones diferentes de los genes *vga(A)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *sal(A)*, *mph(C)*, *msr(A)*, *erm(B)*, *erm(T)* y *erm(C)*, siendo este último gen el más prevalente, detectado en el 89% de los aislados SCoN resistentes a eritromicina. El gen *sal(A)* se

identificó únicamente en las cepas *S. sciuri*. La resistencia a aminoglucósidos estuvo mediada por los genes *aac(6'')-le-aph(2'')-la*, *ant(4'')-la* y *str*. El gen *tet(K)*, solo en combinación con los genes *tet(L)* y/o *tet(M)*, fue el más prevalente entre los aislados resistentes a tetraciclina. Tres aislados *S. haemolyticus* y un aislado *S. lentus* fueron resistentes a ciprofloxacino. La cepa *S. lentus* presentó el cambio aminoacídico S84L en la proteína GyrA, mientras que los aislados *S. haemolyticus* mostraron los cambios aminoacídicos S80L, D84G o D84Y en la proteína GrlA. La resistencia a cloranfenicol estuvo mediada por los genes *cat_{PC221}* o *fexA* en función de la especie, excepto en *S. arlettae*, que se detectaron ambos genes en diferentes cepas. De los cinco aislados identificados como *S. saprophyticus*, solo uno presentó resistencia a ácido fusídico, pero todos albergaban el gen *fusD*. El mecanismo de resistencia a ácido fusídico solo se detectó en una cepa *S. epidermidis* portadora del gen *fusB*. Por último, la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol estuvo mediada por los genes *dfrA*, *dfrD*, *dfrG* y *dfrK*, bien solos o en diferentes combinaciones (Tabla 59). En las cepas *S. cohnii* X100, *S. cohnii* X106 y *S. epidermidis* X104 se detectó la unión entre el gen *tet(L)* y *dfrK*. Dos aislados identificados como *S. equorum* y *S. arlettae* presentaron resistencia a linezolid y eran portadores del gen *cfr*.

Tabla 59. Fenotipo y genotipo de resistencia de los 68 SCoN aislados de las granjas PI y PSE.

| Especie | Número de cepas | Resistencia a antibióticos ^a | |
|-------------------------|-----------------|--|---|
| | | Fenotipo | Genotipo |
| <i>S. arlettae</i> | 17 | PEN-ERI-CLI-STR ¹ -TET ⁹ -CLO ¹ -FUS ¹ | <i>bla_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> ¹⁵ , <i>vga(A)</i> ⁹ , <i>lnu(A)</i> ⁵ , <i>str</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ⁹ , <i>tet(M)</i> ¹ , <i>cat_{PC221}</i> ¹ |
| <i>S. arlettae</i> | 1 | PEN-ERI-CLI-STR-TET-CLO-LZD-SXT | <i>bla_{ARL}</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>lsa(B)</i> , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> , <i>cfr</i> , <i>dfrD</i> |
| <i>S. cohnii</i> | 12 | PEN ¹ -ERI ¹⁰ -CLI-STR ⁶ -TET ⁹ -CLO ³ -FUS-SXT ⁶ | <i>erm(C)</i> ⁹ , <i>msr(A)</i> ⁷ , <i>mph(C)</i> ⁴ , <i>vga(A)</i> ⁵ , <i>lnu(A)</i> ³ , <i>str</i> ⁶ , <i>tet(K)</i> ⁹ , <i>tet(L)</i> ² , <i>tet(M)</i> ⁵ , <i>cat_{PC221}</i> ³ , <i>dfrD</i> ³ , <i>dfrG</i> ² , <i>dfrK</i> ⁴ |
| <i>S. sciuri</i> | 9 | PEN ³ -FOX ¹ -ERI ³ -CLI-STR ⁵ -TET ⁸ -FUS ⁸ -SXT ¹ | <i>mecA</i> ³ , <i>erm(C)</i> ³ , <i>vga(A)</i> ⁴ , <i>lnu(A)</i> ⁶ , <i>lnu(B)</i> ¹ , <i>sal(A)</i> , <i>str</i> ⁵ , <i>tet(K)</i> ⁶ , <i>tet(L)</i> ⁵ , <i>tet(M)</i> ³ , <i>dfrD</i> ¹ |
| <i>S. saprophyticus</i> | 5 | PEN-FOX-ERI ³ -CLI-GEN ² -TOB ² -STR-TET-CLO ¹ -FUS ¹ -SXT ³ | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> ¹ , <i>erm(C)</i> ³ , <i>vga(A)</i> ² , <i>lnu(A)</i> ⁴ , <i>lnu(B)</i> ¹ , <i>aac(6'')-le-aph(2'')-la</i> ² , <i>ant(4'')-la</i> ² , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> ⁴ , <i>tet(L)</i> ⁴ , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> ¹ , <i>fusD</i> , <i>dfrD</i> ³ , <i>dfrG</i> ³ |
| <i>S. epidermidis</i> | 4 | PEN-ERI ² -CLI-TOB ¹ -STR ² -TET ² -FUS ¹ -SXT ¹ | <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> ¹ , <i>msr(A)</i> ² , <i>mph(C)</i> ¹ , <i>vga(A)</i> , <i>lnu(A)</i> ¹ , <i>ant(4'')-la</i> ¹ , <i>str</i> ² , <i>tet(K)</i> ² , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>tet(M)</i> ¹ , <i>fusB</i> ¹ , <i>dfrA</i> ¹ , <i>dfrK</i> ¹ |
| <i>S. nepalensis</i> | 4 | ERI ² -CLI-TET ² -CLO ² -SXT ² | <i>erm(C)</i> ² , <i>mph(C)</i> ¹ , <i>vga(A)</i> ² , <i>lnu(A)</i> ³ , <i>tet(M)</i> ² , <i>fexA</i> ² , <i>dfrD</i> ¹ , <i>dfrG</i> ¹ |
| <i>S. xylosum</i> | 4 | ERI ³ -CLI-GEN ¹ -TOB ¹ -STR ¹ -TET ³ -FUS ¹ -SXT ¹ | <i>erm(C)</i> ² , <i>mph(C)</i> ² , <i>vga(A)</i> ² , <i>lnu(A)</i> ² , <i>lnu(B)</i> ¹ , <i>aac(6'')-le-aph(2'')-la</i> ¹ , <i>ant(4'')-la</i> ¹ , <i>str</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ³ , <i>tet(M)</i> ¹ , <i>dfrD</i> ¹ , <i>dfrG</i> ¹ |
| <i>S. haemolyticus</i> | 3 | PEN ² -FOX ¹ -ERI-CLI-GEN ¹ -TOB ² -STR ² -TET-CIP ^b -CLO ¹ -SXT ¹ | <i>mecA</i> ¹ , <i>blaZ</i> ² , <i>erm(C)</i> , <i>erm(T)</i> ¹ , <i>msr(A)</i> ¹ , <i>vga(A)</i> ² , <i>lnu(B)</i> ¹ , <i>aac(6'')-le-aph(2'')-la</i> ¹ , <i>ant(4'')-la</i> ² , <i>str</i> ² , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>tet(M)</i> ¹ , <i>fexA</i> ¹ , <i>dfrK</i> ¹ |
| <i>S. simulans</i> | 3 | CLI-STR ² -TET ¹ -CLO ¹ | <i>vga(A)</i> , <i>lnu(A)</i> ² , <i>str</i> ² , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>cat_{PC221}</i> ¹ |

| Especie | Número de cepas | Resistencia a antibióticos ^a | |
|-----------------------|-----------------|---|---|
| | | Fenotipo | Genotipo |
| <i>S. chromogenes</i> | 2 | CLI ¹ | <i>vga(A)</i> ¹ , <i>Inu(A)</i> ¹ |
| <i>S. equorum</i> | 1 | PEN-FOX-ERI-CLI-STR-TET-CLO-LZD | <i>mecA</i> , <i>erm(B)</i> , <i>lsa(B)</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>cat_{pC221}</i> , <i>cfr</i> |
| <i>S. lentus</i> | 1 | ERI-CLI-GEN-TOB-STR-TET-CIP ^c -CLO-SXT | <i>erm(C)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>Inu(A)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>cat_{pC221}</i> , <i>dfrD</i> , <i>dfrG</i> |
| <i>S. succinus</i> | 1 | PEN-TET | <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> |
| <i>S. warneri</i> | 1 | PEN | <i>blaZ</i> |

^aEl superíndice indica el número de cepas cuando no todas las cepas presentaron la característica indicada.

^bCambio aminoacídico S80L, D84G o D84Y en la proteína GrIA.

^cCambio aminoacídico S84L en la proteína GyrA.

No se pudo determinar el tipo SCC*mec* en ninguno de los aislados portadores del gen *mecA*, bien porque no fueron tipables o porque no se pudieron adscribir a ningún tipo SCC*mec* previamente descrito (Anexo II).

1.3. *S. aureus* de animales de producción con signos de infección

A continuación, se procedió a realizar la caracterización de las 23 cepas de *S. aureus* aisladas de cerdos con signos de infección procedentes de 20 granjas, y cuyos datos se resumen en la **Tabla 60**. Veintiuna de las cepas fueron SARM portadoras del gen *mecA*. La PCR específica reveló que todos los aislados SARM resistentes a tetraciclina (n=20) pertenecían al linaje genético CC398, adscritos a los *spa*-tipos t011 (n=13), t034 (n=3), t1456 (n=2) y t1451 (n=2). Las tres cepas restantes sensibles a tetraciclina (2 SASM y 1 SARM) pertenecían al linaje ST9/CC9, con los *spa*-tipos t899 (n=2) y al nuevo *spa*-tipo t19163 (n=1). Las cepas SARM pertenecientes al CC398 portaban el gen *mecA* en el SCC*mec* tipo V, mientras que la cepa SARM perteneciente al ST9/CC9 portaba un SCC*mec* no tipable. Los aislados del CC398 presentaron el *agr* tipo I y los que pertenecían al ST9/CC9 eran *agr* tipo II.

Todas las cepas, excepto dos, presentaron un perfil de multiresistencia. Las cepas *S. aureus* fueron resistentes a (número de aislados resistentes): penicilina (21), oxacilina (21), eritromicina (16), clindamicina (20), gentamicina (7), tobramicina (7), amikacina (1), tetraciclina (22), ciprofloxacino (14), levofloxacino (14), cloranfenicol (5) y linezolid (1) (**Tabla 60**). La resistencia a antibióticos β-lactámicos detectada en 21 de las cepas *S. aureus* estuvo mediada, además de por el gen *mecA*, por el gen *blaZ* en 19 aislados. La resistencia a macrólidos y/o lincosamidas estuvo mediada por diferentes combinaciones de los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)*, *Inu(A)*, *Inu(B)* y *vga(A)*. El gen *erm(C)* fue el más prevalente entre las cepas *S. aureus*, detectándose en 14 de los 15 aislados resistentes a eritromicina y clindamicina. Se detectó resistencia a al menos a uno de los antibióticos aminoglucósidos testados en 10 de las cepas *S. aureus*, y se identificaron los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(4')-Ia* y/o *aph(3')-III*. Todos los aislados resistentes a tetraciclina eran portadores del gen *tet(M)*, en combinación con los genes *tet(K)* y/o *tet(L)*.

Tabla 60. Características de las 23 cepas de *S. aureus* aisladas de procesos infecciosos de cerdos.

| Cepa | Granja | Muestra | Tipado molecular | | | | Resistencia a antibióticos | |
|-------|--------|------------------|------------------|-------|------------|-----------------------------|---|--|
| | | | <i>spa</i> -tipo | ST/CC | <i>agr</i> | SCC <i>mec</i> ^a | Fenotipo ^b | Genotipo |
| X2062 | 1 | Herida piel | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) |
| X2072 | 2 | Herida piel | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN ^l -TOB-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>ant</i> (4')-Ia |
| X2071 | 3 | Herida piel | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-TET | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>erm</i> (T), <i>aac</i> (6')-Ie-aph(2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) |
| X2078 | 3 | Herida piel | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CLO | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (C), <i>erm</i> (T), <i>vga</i> (A), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>fexA</i> |
| X2083 | 4 | Herida piel | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-CLI ^l -TET | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>lnu</i> (A), <i>vga</i> (A), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) |
| X2084 | 5 | Herida piel | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>vga</i> (A), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) |
| X2067 | 6 | Líquido sinovial | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) |
| X2070 | 7 | Líquido sinovial | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie-aph(2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) |
| X2075 | 8 | Líquido sinovial | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>lnu</i> (B), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) |
| X2063 | 9 | Herida piel | t034 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CLO-LZD | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M), <i>fexA</i> , <i>cfr</i> |
| X2065 | 10 | Líquido sinovial | t034 | CC398 | I | V | PEN-FOX-CLI ^l -TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>lnu</i> (A), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) |
| X2081 | 11 | Líquido sinovial | t034 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-TET-CIP ^d -LEV-CLO | <i>mecA</i> , <i>erm</i> (C), <i>ant</i> (4')-Ia, <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M), <i>fexA</i> |
| X2064 | 12 | Herida piel | t1456 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (B), <i>lnu</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie-aph(2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) |
| X2073 | 8 | Líquido sinovial | t1456 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI ^l -TET-LEV ^l | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) |
| X2076 | 13 | Líquido sinovial | t1451 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie-aph(2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) |
| X2077 | 14 | Líquido sinovial | t1451 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-AMK-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>erm</i> (T), <i>vga</i> (A), <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (K), <i>aac</i> (6)-Ie-aph(2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>aph</i> (3')-III |

| Cepa | Granja | Muestra | Tipado molecular | | | | Resistencia a antibióticos | |
|--------------|--------|------------------------------------|---------------------|---------|------------|-----------------------------|---|---|
| | | | <i>spa</i> -tipo | ST/CC | <i>agr</i> | SCC <i>mec</i> ^a | Fenotipo ^b | Genotipo |
| X2079 | 15 | Líquido sinovial | t19163 ^c | ST9/CC9 | II | NT | PEN-FOX-CLI ^l | <i>mecA</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>vga(A)</i> |
| X2074 | 16 | Líquido sinovial | t899 | ST9/CC9 | II | - | CLI-TET-GEN-TOB-CLO | <i>lnu(B)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> |
| X2066 | 17 | Necropsia (pulmón) | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> |
| X2080 | 18 | Necropsia (líquido cerebroespinal) | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>tet(M)</i> |
| X2069 | 19 | Necropsia (intestino) | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-TET | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> |
| X2082 | 20 | Necropsia (riñón) | t011 | CC398 | I | V | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-GEN ^l -TOB-CIP ^d -LEV | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> |
| X2068 | 16 | Necropsia (bazo) | t899 | ST9/CC9 | II | - | CLI-TET-GEN-TOB-CIP ^d -CLO | <i>lnu(B)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>fexA</i> |

^aNT, no tipable.

^bI, resistencia intermedia.

^c*spa*-tipo nuevo.

^dCambios aminoacídicos S84L y S80F en las proteínas GyrA y GrIA, respectivamente.

Las cepas resistentes a fluoroquinolonas presentaban los cambios aminoacídicos S84L y S80F en las proteínas GyrA y GrIA, respectivamente. Dos cepas mostraron resistencia intermedia a ciprofloxacino o levofloxacino, pero no se detectaron cambios aminoacídicos en las proteínas GyrA o GrIA. Cinco aislados *S. aureus* (23%) fueron resistentes a cloranfenicol y todos albergaban el gen *fexA*. Además, la cepa X2063 fue resistente a linezolid y portaba el gen *cfr* (**Tabla 60**). Ninguna de las cepas presentó resistencia a vancomicina, teicoplanina, trimetoprim-sulfametoxazol, daptomicina o mupirocina.

1.4. SCoP de animales de compañía con signos de infección

A continuación, se pretendió analizar las características genéticas de 33 cepas de SCoP aisladas de procesos infecciosos de animales de compañía (28 perros y 5 gatos). Veintiocho de las cepas fueron identificadas como *S. pseudintermedius* y cinco como *S. aureus*. Diecinueve de los 28 aislados *S. pseudintermedius* (68%) provenían de infecciones urinarias o del aparato reproductor. Los restantes se obtuvieron de muestras de infecciones del tegumento (n=5), quirúrgicas (n=1), séptica (n=1) y de huesos-articulaciones (n=1). Las cepas *S. aureus* fueron aisladas de infecciones del aparato urinario-reproductivo (n=2), tegumentarias (n=1), respiratorias (n=1) y quirúrgicas (n=1) (**Tabla 61**).

Se detectaron nueve cepas resistentes a meticilina portadoras del gen *mecA* (ocho SPRM y una SARM), que representaban el 27% del total de aislados. Todas las cepas resistentes a meticilina fueron aisladas de perros (excepto una cepa SPRM), y se obtuvieron durante los años 2009 (cuatro SPRM), 2010 (tres SPRM y un SARM) y 2011 (un SPRM). El 55% del total de las cepas procedentes de animales de compañía eran multiresistentes (**Tabla 61**).

Tres de los animales estudiados eran portadores recurrentes de SPRM y SARM. Se detectaron cepas con las mismas características que SPRM C3870, SPRM C3871 y SARM C3883, aislados de los mismos perros, dos meses, un año y tres meses después del primer aislamiento, respectivamente. Únicamente se incluyó en el estudio la primera cepa aislada por animal.

Cinco de los ocho aislados SPRM fueron tipados como ST71, *agr*-III, portaban el SCC*mec* tipo III y pertenecían al mismo patrón de PFGE (A). Dos aislados SPRM obtenidos de infecciones urinarias o del aparato reproductor, fueron tipados como ST68, *agr*-IV, SCC*mec* V y presentaron el mismo patrón de PFGE (B), con dos subtipos diferentes (B1 y B2). El SPRM restante, fue tipado como ST258-*agr*II-SCC*mec*IV y presentó el patrón de PFGE C (**Tabla 61**).

Las tasas de resistencia a antibióticos de las cepas *S. pseudintermedius*, tanto *S. pseudintermedius* sensible a meticilina (SPSM) como SPRM, se muestran en la **Figura 19**. Las tasas de resistencia a eritromicina, clindamicina, kanamicina, estreptomina, ciprofloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol fueron significativamente mayores entre las cepas SPRM, respecto a SPSM. Además, solo se detectó resistencia a gentamicina y tobramicina entre las cepas SPRM (**Figura 19**). Ocho de los 28 aislados *S. pseudintermedius* fueron SPRM (29%). Nueve SPSM y todos los SPRM fueron multiresistentes, mientras que dos SPSM fueron sensibles a todos los antibióticos analizados. En relación con *S. pseudintermedius*, los genes *mecA* y/o *blaZ* mediaron la resistencia a antibióticos β -lactámicos.

Tabla 61. Caracterización genética de las 28 cepas *S. pseudintermedius* y cinco *S. aureus* aisladas de procesos infecciosos de animales de compañía.

| Cepa | Especie | Año | Origen | Tipo de infección ^a | Tipado molecular | Resistencia a antibióticos | |
|--------------------|---------|------|--------|--------------------------------|---|---|---|
| | | | | | <i>spa</i> -MLST/ <i>CC-agr</i> - <i>SCCmec</i> | Fenotipo | Genotipo |
| C3871 ^b | SPRM | 2009 | Perro | B-J | ST71- <i>agr</i> III- <i>SCCmec</i> III | PEN-OXA-ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-STR-TET-CIP ^e -CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>erm</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (K), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfr</i> G |
| C3880 | SPRM | 2010 | Perro | S | ST71- <i>agr</i> III- <i>SCCmec</i> III | PEN-OXA-ERI-CLI-GEN-TOB-STR-TET-CIP ^e -CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (K), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfr</i> G |
| C3885 | SPRM | 2010 | Perro | I | ST71- <i>agr</i> III- <i>SCCmec</i> III | PEN-OXA-ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-STR-TET-CIP ^e -CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (K), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfr</i> G |
| C5355 | SPRM | 2010 | Perro | B-J | ST71- <i>agr</i> III- <i>SCCmec</i> III | PEN-OXA-ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-STR-CIP ^e -SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>erm</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>dfr</i> G |
| C5613 | SPRM | 2011 | Perro | U-R | ST71- <i>agr</i> III- <i>SCCmec</i> III | PEN-OXA-ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-STR-TET-CIP ^e -CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>erm</i> (B), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (K), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfr</i> G |
| C3866 | SPRM | 2009 | Gato | U-R | ST68- <i>agr</i> IV- <i>SCCmec</i> V | PEN-OXA-ERI-CLI-KAN-STR-TET-CIP ^e -SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>tet</i> (M), <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>dfr</i> G |
| C3870 ^c | SPRM | 2009 | Perro | U-R | ST68- <i>agr</i> IV- <i>SCCmec</i> V | PEN-OXA-ERI-CLI-KAN-STR-TET-CIP ^e -SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (M), <i>dfr</i> G |
| C3869 | SPRM | 2009 | Perro | U-R | ST258- <i>agr</i> II- <i>SCCmec</i> IV | PEN-OXA-ERI-CLI-KAN-STR-TET-SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (M), <i>dfr</i> G |
| C5344 | SPSM | 2009 | Perro | U-R | | PEN-ERI-CLI-KAN-STR-TET-CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (M), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfr</i> G |
| C5345 | SPSM | 2009 | Gato | SI | | PEN-ERI-CLI-KAN-STR-TET-CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (M), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfr</i> G |
| C5360 | SPSM | 2011 | Perro | U-R | | PEN-ERI-CLI-KAN-STR-TET-CLO-SXT | <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (B), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (K), <i>dfr</i> G, <i>cat</i> _{pC221} |

| Cepa | Especie | Año | Origen | Tipo de infección ^a | Tipado molecular | | Resistencia a antibióticos | |
|-------|---------|------|--------|--------------------------------|---|--------------------------|--|--|
| | | | | | <i>spa</i> -MLST/CC- <i>agr</i> -SCC <i>mec</i> | Fenotipo | Genotipo | |
| C5347 | SPSM | 2009 | Perro | U-R | | PEN-ERI-CLI-TET-CLO-SXT | <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (B), <i>tet</i> (M), <i>cat</i> _{pC221} , <i>dfrG</i> , <i>dfrK</i> ⁹ | |
| C3877 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | PEN-KAN-STR-TET | <i>blaZ</i> , <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>tet</i> (M) | |
| C5351 | SPSM | 2010 | Gato | U-R | | PEN-KAN-TET | <i>blaZ</i> , <i>aph</i> (3')-III, <i>tet</i> (M) | |
| C3881 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | STR-TET-CIP ⁹ | <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) | |
| C5354 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | PEN-TET-SXT | <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (M), <i>dfrG</i> | |
| C5358 | SPSM | 2011 | Perro | U-R | | PEN-TET-SXT | <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (M), <i>dfrG</i> , <i>dfrK</i> ⁹ | |
| C3875 | SPSM | 2010 | Perro | I | | PEN-TET | <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (M) | |
| C3876 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | PEN-TET | <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (M) | |
| C5356 | SPSM | 2011 | Perro | U-R | | PEN-TET | <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (M) | |
| C5362 | SPSM | 2011 | Perro | I | | PEN-TET | <i>blaZ</i> , <i>tet</i> (M) | |
| C5353 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | TET | <i>tet</i> (M) | |
| C3873 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | PEN | <i>blaZ</i> | |
| C3878 | SPSM | 2010 | Perro | U-R | | PEN | <i>blaZ</i> | |
| C3879 | SPSM | 2010 | Perro | I | | PEN | <i>blaZ</i> | |
| C5357 | SPSM | 2011 | Perro | U-R | | PEN | <i>blaZ</i> | |

| Cepa | Especie | Año | Origen | Tipo de infección ^a | Tipado molecular | | Resistencia a antibióticos | |
|--------------------------|---------|------|--------|--------------------------------|---|---|---|--|
| | | | | | <i>spa</i> -MLST/CC- <i>agr</i> -SCC <i>mec</i> | Fenotipo | Genotipo | |
| C3874 | SPSM | 2010 | Perro | I | | Sensible | - | |
| C5359 | SPSM | 2011 | Perro | U-R | | Sensible | - | |
| C3883^d | SARM | 2010 | Perro | S | t011-ST398/CC398- <i>agr</i> I-SCC <i>mec</i> V | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-TET-CIP ^f -SXT | <i>bla</i> Z, <i>mec</i> A, <i>erm</i> (B), <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (K), <i>dfr</i> A, <i>dfr</i> G | |
| C5612 | SASM | 2009 | Perro | U-R | t10576-ST1660- <i>agr</i> I | PEN | <i>bla</i> Z | |
| C5650 | SASM | 2009 | Gato | R | t005-ST22/CC22- <i>agr</i> I | PEN | <i>bla</i> Z | |
| C5610 | SASM | 2011 | Perro | U-R | t045-ST5/CC5- <i>agr</i> I | PEN | <i>bla</i> Z | |
| C5609 | SASM | 2011 | Gato | I | t045-ST5/CC5- <i>agr</i> I | Sensible | - | |

^aH-A, infección de huesos-articulaciones; U-R, infección urinaria o del aparato reproductor; R, infección respiratoria; T, infección del tegumento; Q, infección quirúrgica; S, infección séptica.

^bSe volvió a detectar un año después del primer aislamiento.

^cSe volvió a detectar dos meses después del primer aislamiento.

^dSe volvió a detectar tres meses después del primer aislamiento.

^eCambios aminoacídicos S84L y S80I en las proteínas GyrA y GrIA, respectivamente.

^fCambios aminoacídicos S84L y S80F en las proteínas GyrA y GrIA, respectivamente.

^gEl gen *dfrK* estaba localizado en el Tn559 integrado en el gen cromosómico *radC*.

La resistencia a macrólidos y lincosamidas estaba mediada por el gen *erm(B)*, y la resistencia a aminoglucósidos por diferentes combinaciones de los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(6)-Ia* y *aph(3')-IIIa*. Las cepas resistentes a tetraciclina portaban los genes *tet(K)* y/o *tet(M)*. Los ocho aislados que presentaron resistencia a cloranfenicol albergaban el gen *cat_{pC221}*, mientras que el gen *dfrG* se detectó en las 14 cepas resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol, en combinación con el gen *dfrK* en dos de ellas. Se detectaron los cambios aminoacídicos S84L y S80I en los genes codificantes de las proteínas GyrA y GrlA, respectivamente, en las ocho cepas *S. pseudintermedius* resistentes a ciprofloxacino (**Tabla 61**). Ninguna de las cepas *S. pseudintermedius* mostró resistencia a vancomicina, linezolid o ácido fusídico.

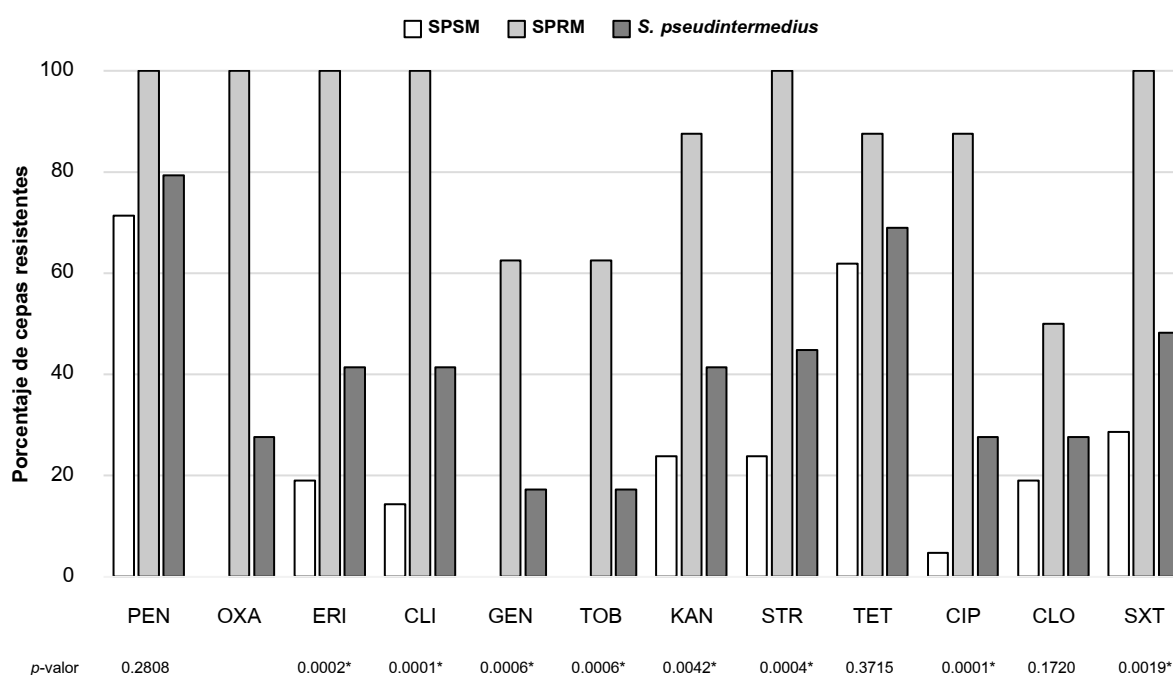


Figura 19. Tasas de resistencia a antibióticos detectadas en las cepas SPSM, SPRM y en el total de *S. pseudintermedius*.

El p-valor (test exacto de Fisher) se muestra bajo la figura. Los asteriscos indican los antibióticos para los cuales se encontraron diferencias significativas entre las tasas de resistencia de las cepas SPSM y SPRM ($P \leq 0,05$).

La única cepa SARM fue tipada como t011-ST398/CC398-*agrI*-*SCCmecV* y fue aislada de una infección quirúrgica de un perro. Esta cepa presentó un fenotipo de multiresistencia y portaba los genes *blaZ*, *mecA*, *erm(B)*, *erm(C)*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *tet(K)*, *tet(M)*, *dfrA* y *dfrG*. Se detectaron los cambios aminoacídicos S84L y S80L en las proteínas GyrA y GrlA, respectivamente (**Tabla 61**). Las cepas SASM fueron tipadas como t045-ST5/CC5 (n=2), t10576-ST1660 (n=1) y t005-ST22/CC22 (n=1). Un aislado SASM presentó sensibilidad a todos los antibióticos analizados, y los tres restantes presentaron resistencia solo para la penicilina, mediada por el gen *blaZ* (**Tabla 61**).

Mediante PCRs específicas del Tn559, se evidenció en la cepa SPSM C5358 la presencia del gen *dfrK* en el Tn559, integrado en el gen cromosómico *radC*. Sin embargo, en la cepa SPSM C5347 no se pudo determinar mediante PCR la unión entre Tn559 y el gen *radC*. El análisis del genoma de esta cepa por secuenciación masiva permitió identificar el Tn559 completo y su sitio de integración (GenBank MT252966) (**Figura 20**). El alineamiento nucleotídico y aminoacídico del Tn559 de la cepa C5347 con la secuencia de

referencia del transposón Tn559 de *S. aureus* (GenBank FN677369), reveló la presencia de una inserción y tres sustituciones nucleotídicas en la región no codificante aguas abajo del gen *dfrK*. Además, se detectó una mutación en la secuencia de hibridación del primer *forward* del gen *radC* (*radC*-fw: 5'-GTC/AGGAATAGGGCGTA-3'), lo que pudo dar lugar a la ausencia de amplificación mediante PCR. El alineamiento de la secuencia del gen *radC* de la cepa C5347 con el respectivo del aislado *S. pseudintermedius* C2719 portador del transposón Tn558 (GenBank HF679552), permitió identificar siete mutaciones puntuales (C27T, G114C, C219A, C301T, G444C, T516C, G540T) y además dos mutaciones más que resultaron en cambios aminoacídicos en la secuencia de RadC (K63N, A103D).

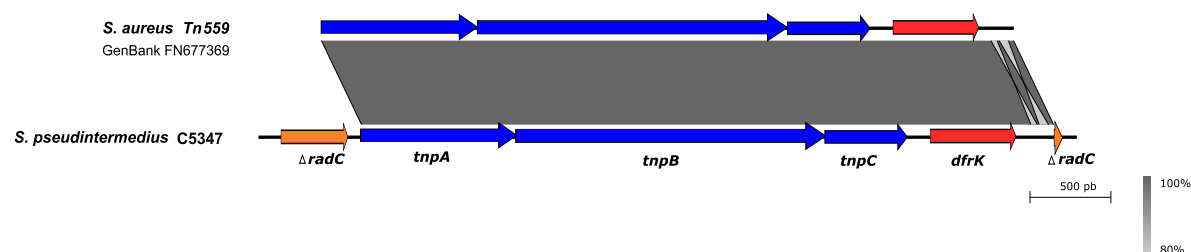


Figura 20. Comparación BLAST del entorno genético del gen *dfrK* identificado en la cepa *S. pseudintermedius* C5347 (GenBank FN677369) y la secuencia de referencia del transposón Tn559 de *S. aureus* (GenBank FN677369).

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; azul, recombinación y transposición; naranja, función conocida.

2. Mecanismos de resistencia a linezolid en *Staphylococcus* spp. de diferentes orígenes. Estudios comparativos con *Enterococcus* spp.

Una vez analizadas las características de los aislados de *Staphylococcus* spp. de los diferentes orígenes, profundizamos en el estudio de las cepas LZD^R, dado la gran relevancia clínica de este antibiótico. Asimismo, quisimos analizar si los genes de resistencia a linezolid se encontraban también presentes en otros microorganismos Gram-positivos con los que *Staphylococcus* comparte con frecuencia material genético, como es el caso de *Enterococcus* spp., y realizar una comparativa con aislados clínicos LZD^R de *Staphylococcus* spp. y de *Enterococcus* spp. En el **Anexo IV** se resumen los mecanismos de resistencia a linezolid detectados en esta tesis.

2.1. *Staphylococcus* spp. LZD^R de muestras de aire de granjas porcinas y de procesos infecciosos de animales de producción

En este trabajo se han detectado dos cepas de SCoN aisladas de muestras de aire del interior de la granja PI que eran LZD^R (CMI 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$): *S. equorum* X109 y *S. arlettae* X114. Ambos aislados eran portadores del gen de resistencia *cfr*, y fueron negativos para los genes *optrA*, *poxtA*, *cfr(B)* y *cfr(D)* (**Figura 21**). En estas cepas no se detectaron mutaciones en el dominio V del ARNr 23S, ni cambios aminoacídicos en los genes codificantes de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22.

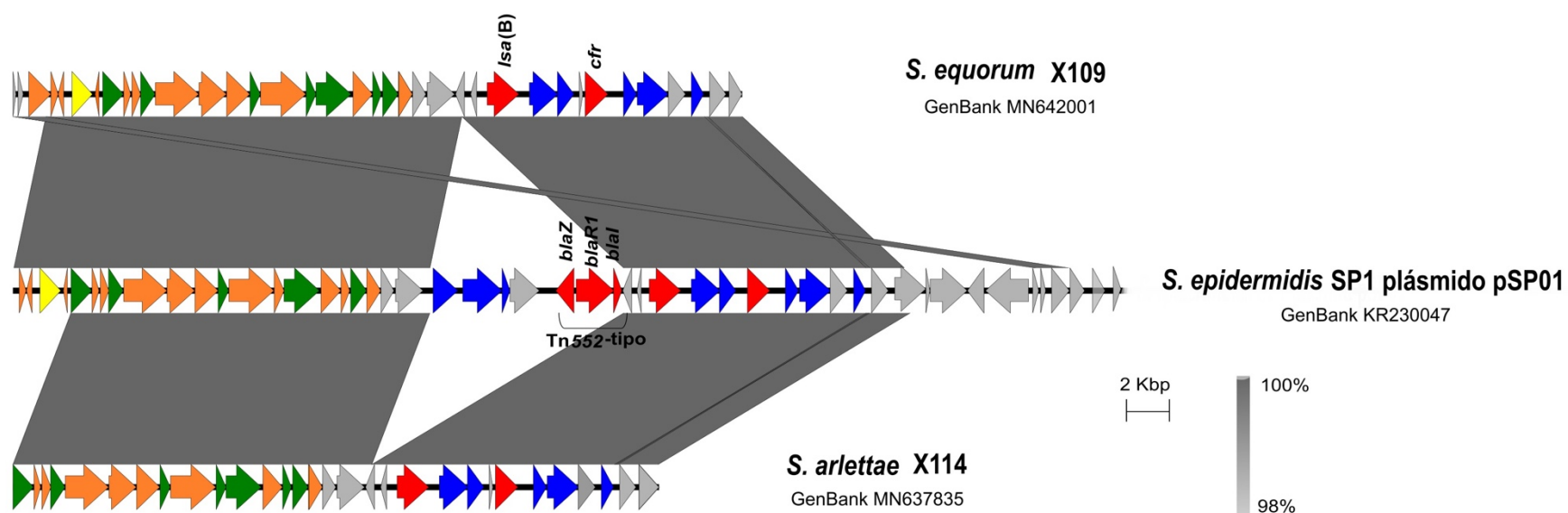


Figura 21. Comparación BLAST del entorno genético del gen *cfr* identificado en los aislados *S. equorum* X109 (GenBank MN642001) y *S. arlettae* X114 (GenBank MN637835) procedentes del aire de la granja porcina PI y la secuencia de referencia del plásmido pSP01 de *S. epidermidis* SP1 (GenBank KR230047).

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; azul, recombinación y transposición; verde, conjugación; amarillo, replicación; naranja, función conocida; gris, función desconocida.

Los SCoN Presentaron una CMI a cloranfenicol de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y CMIs a florfenicol de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. equorum* X109 y *S. arlettae* X114, respectivamente. No se consiguió transferir el gen *cfr* mediante conjugación al mutante resistente a rifampicina de la cepa *S. aureus* ATCC[®] 29213.

En la **Figura 21**, se muestra el entorno genético del gen *cfr*, determinado por secuenciación masiva en los aislados *S. equorum* X109 (GenBank MN642001) y *S. arlettae* X114 (GenBank MN637835), en comparación con la secuencia de referencia del plásmido pSP01 de *S. epidermidis* SP1 de origen clínico (GenBank KR230047). El entorno genético del gen *cfr* de los dos aislados SCoN de la granja porcina tiene una gran similitud, y la principal diferencia con el plásmido pSP01 es la ausencia del operón *blaZ* (*blaZ-blaI-blaR1*) en las cepas de este estudio. Aguas arriba del gen *cfr*, se localiza en gen *Isa(B)*, que codifica un transportador ABC que confiere sensibilidad reducida a lincosamidas. Además, el análisis de las secuencias reveló la presencia de numerosos genes *tra* codificantes de proteínas relacionadas con el proceso de transferencia, así como una proteína Rep.

Entre las cepas de *S. aureus* de cerdos con signos de infección analizadas en este estudio, la cepa SARM X2063, obtenida de una muestra de herida de un cerdo fue LZD^R (CMI 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Esta cepa, tipada como t034-CC398-*agrI*-SCC*mecV*, presentó una CMI a clindamicina y cloranfenicol de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y a florfenicol de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La cepa X2063 era portadora del gen *cfr* y fue negativa para los genes *optrA*, *poxtA*, *cfr(B)* y *cfr(D)*. No se detectaron mutaciones en el dominio V del ARNr 23S, ni cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales L3 y L22. Sin embargo, la cepa presentó el cambio aminoacídico V109A en el gen *rplD*, codificante de la proteína ribosomal L4.

El gen *cfr* no pudo ser transferido al mutante resistente a rifampicina de *S. aureus* ATCC[®] 29213, usando linezolid para la selección de transconjugantes. El mapeo por PCR permitió determinar la localización del gen *cfr*, junto con el gen *fexA*, en una variante del Tn558, previamente descrita en el plásmido pSCFS7 de *S. aureus* (GenBank FR675942) (**Figura 22**). En esta variante del Tn558, la transposasa TnpB se encuentra truncada por la inserción del gen *bin3* codificante de una ADN invertasa, el gen *cfr* y la secuencia de inserción IS21-558. El alineamiento de la variante del Tn558 del plásmido pSCFS7 y la identificada en la cepa procedente del cerdo reveló una identidad nucleotídica del 100% (**Figura 22**).

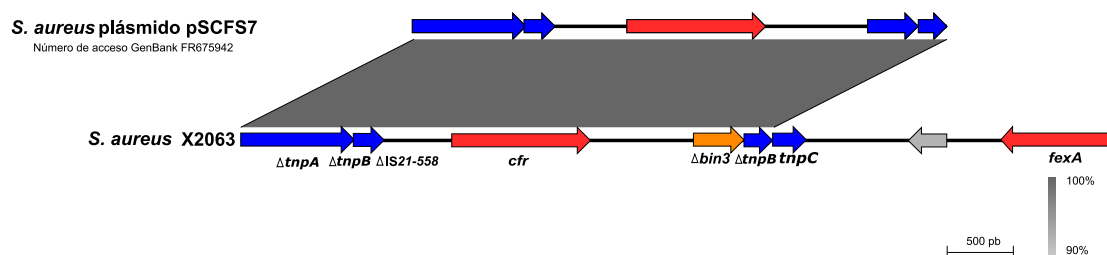


Figura 22. Comparación BLAST del entorno genético del gen *cfr* en la cepa *S. aureus* X2063 de origen porcino y la secuencia de referencia del plásmido pSCFS7 de *S. aureus* (GenBank FR675942).

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; azul, recombinación y transposición; naranja, función conocida; gris, función desconocida.

2.2. *Staphylococcus* spp. LZD^R de origen clínico

Se estudiaron 18 cepas de *Staphylococcus* spp. LZD^R (3 *S. aureus*, 14 *S. epidermidis* y 1 *S. hominis*) procedentes de cuatro hospitales españoles, para determinar los mecanismos más prevalentes y su relación con los mecanismos detectados en cepas ambientales o de animales de producción. Las características de las cepas resistentes a linezolid se muestran en la **Tabla 62**. Los dos aislados SARM (CMI a linezolid 16 y 8 µg/mL) portaban el gen de multiresistencia *cfr* y el cambio aminoacídico V118A en el gen codificante de la proteína ribosomal L4. La cepa SARM (CMI a linezolid 8 µg/mL) mostró la delección de dos aminoácidos en las posiciones 66 y 67 y el cambio aminoacídico V118A en la proteína ribosomal L4. Las 14 cepas *S. epidermidis* mostraron CMIs de más de 256 µg/mL a linezolid, y se detectaron las mutaciones G2576T (n=13) y C2534T (n=1) en el dominio V del ARNr 23S. Además, entre las cepas *S. epidermidis* también se identificaron diferentes cambios aminoacídicos e inserciones en las proteínas ribosomales L3 y/o L4, mientras que todas las cepas tenían la variante salvaje de L22 (**Tabla 62**). La cepa *S. hominis*, con una CMI a linezolid de 32 µg/mL, presentó la mutación G2576T en el dominio V del ARNr 23S. No se detectaron los genes *optrA*, *poxtA*, *cfr(B)* ni *cfr(D)* entre las cepas clínicas de *Staphylococcus* spp. LZD^R.

Las dos cepas SARM portadoras del gen *cfr* fueron tipadas como t011-ST398/CC398-*agrI* y t2220-ST125/CC5-*agrII*, mientras que la cepa SARM fue tipada como t1688-ST123-*agrIV*. Todas las cepas *S. epidermidis* LZD^R pertenecieron al linaje ST2. Todas las cepas de estafilococos presentaron un fenotipo de multiresistencia y, excepto el aislado SARM, todas fueron resistentes a metilina portadoras del gen *mecA*. Se detectaron los SCC*mec* IV y V en las cepas SARM C9026 y X1761, respectivamente, mientras que todas las cepas *S. epidermidis* resistentes a metilina (SERM) portaban el SCC*mec* tipo III. La cepa *S. hominis* portaba un SCC*mec* no tipable.

Excepto la cepa SARM-CC398 portadora del gen *cfr*, el resto presentaron diferentes patrones de resistencia a macrólidos y lincosamidas, mediados por los genes *erm(A)*, *erm(C)*, *msr(A)*, *Inu(A)* y/o *vga(A)*. Todas las cepas LZD^R menos el aislado SARM, fueron resistentes a al menos un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos y se detectaron los genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-III*, *str*, y/o *ant(6)-Ia* (**Tabla 62**). La resistencia a tetraciclina, detectada en tres cepas, estuvo mediada por los genes *tet(K)*, *tet(L)* y/o *tet(M)*. En todas las cepas resistentes a ciprofloxacino y levofloxacino se identificaron cambios aminoacídicos en las proteínas GyrA (S84L, S84Y, S84F, E88K y/o A457T) y GrlA (S80F, D84Y, G84F y/o Y410F). El gen *fexA* se detectó en los dos aislados SARM portadores del gen *cfr* que presentaron resistencia a fenicoles. Todas las cepas SCoN LZD^R fueron resistentes a cloranfenicol, pero no se detectó ningún gen de resistencia que confiera resistencia a este antibiótico en ellas. Siete cepas SCoN fueron resistentes a mupirocina y el gen *mupA* se detectó en cuatro de ellas. Todas las cepas *S. epidermidis* mostraron resistencia a ácido fusídico que estuvo mediada por el gen *fusB*. Los genes *dfrA* (n=14) y *dfrG* (n=1) se detectaron en las cepas SCoN. Por último, un aislado *S. epidermidis* presentó resistencia intermedia a vancomicina, pero no se detectó la presencia de los genes *vanA* o *vanB*.

La cepa SARM X1761 LZD^R procedente del Hospital Arnau Vilanova de Lleida y adscrita al complejo clonal CC398, fue aislada de una muestra nasal de un trabajador de una granja porcina y fue considerada colonización.

Tabla 62. Caracterización de los 18 *Staphylococcus* spp. LZD^R procedentes de hospitales españoles.

| Cepa | Especie | Hospital ^a | Muestra | Tipado molecular | CMI linezolid (µg/mL) | Mecanismos de resistencia a linezolid ^b | Resistencia a antibióticos | |
|--------|-----------------------|-----------------------|---------------------|--|--------------------------|---|--|---|
| | | | | <i>spa</i> -ST/CC- <i>agr</i> - SCC <i>mec</i> | | | Fenotipo ^c | Genotipo |
| X1761 | <i>S. aureus</i> | HAV | Nasal | t011-ST398/CC398- <i>agr</i> I-SCC <i>mec</i> V | 8 | <i>cfr</i> ; L4 (V118A) | OXA-PEN-CLI-AMK-TOB-TET- CIP ^{d,j} -LEV-CLO-FFN-LZD | <i>mecA</i> , <i>bla</i> Z, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M), <i>cfr</i> , <i>fexA</i> |
| C9026 | <i>S. aureus</i> | HRV | Faríngea | t2220-ST125/CC5- <i>agr</i> II- SCC <i>mec</i> IV | 16 | <i>cfr</i> ; L4 (V118A) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-STR- CIP ^{d,h,j,m} -LEV-CLO-FFN-LZD-FOS | <i>mecA</i> , <i>bla</i> Z, <i>msr</i> (A), <i>aph</i> (3')-III, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>cfr</i> , <i>fexA</i> , <i>fosD</i> |
| C9906 | <i>S. aureus</i> | HSP | Esputo | t1688-ST123- <i>agr</i> IV | 8 | L4 (del-K66Q67, V118A) | PEN-AMP-TET-LZD | <i>bla</i> Z, <i>tet</i> (L) |
| C10354 | <i>S. epidermidis</i> | HRV | Nasal | ST2/CC5-SCC <i>mec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, V154L) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN- TOB-STR-TET-CIP ^{e,g,i,k} -LEV-CLO- LZD-VAN'-FOS-MUP-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| C10356 | <i>S. epidermidis</i> | HRV | Faríngea | ST2/CC5-SCC <i>mec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T); L4 (G69R, in- 70G71) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN- TOB-CIP ^{e,i,k} -LEV-CLO-LZD-FUS- SXT | <i>mecA</i> , <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>str</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X466 | <i>S. epidermidis</i> | HRV | Piel | ST2/CC5-SCC <i>mec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, V154L, M156T); L4 (in-70G71) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN- TOB-CIP ^{e,i,k} -LEV-CLO-LZD-MUP- FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| C10515 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Sangre | ST2/CC5-SCC <i>mec</i> III | >256 | ARNr 23S (C2534T); L3 (L101V, A157R); L4 (N217S) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN- TOB-STR-CIP ^{f,g,h} -LEV-CLO-LZD- FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>bla</i> Z, <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>ant</i> (4')-Ia, <i>str</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| C10040 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Catéter dialisis | ST2/CC5-SCC <i>mec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (A83V, L101V, G139V, H146R, M156T) | OXA-PEN-AMP-GEN-TOB- CIP ^{e,i,k} - LEV-LZD-CLO-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia, <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |

| Cepa | Especie | Hospital ^a | Muestra | Tipado molecular | CMI linezolid (µg/mL) | Mecanismos de resistencia a | Resistencia a antibióticos | |
|-------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---|--------------------------|---|---|--|
| | | | | <i>spa</i> -ST/CC- <i>agr</i> - <i>SCCmec</i> | | linezolid ^b | Fenotipo ^c | Genotipo |
| X530 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Sangre | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T); L4 (G69AR, in-70G71) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-LZD-CLO-MUP-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>ant</i> (4')- <i>la</i> , <i>mupA</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X544 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Sangre | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T); L4 (in-70G71) | OXA-PEN-AMP-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>ant</i> (4')- <i>la</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X548 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Orina | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | 23S rRNA (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T) | OXA-PEN-AMP-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-MUP-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>vga</i> (A), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>ant</i> (4')- <i>la</i> , <i>mupA</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X507 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Sangre | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-MUP-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>ant</i> (4')- <i>la</i> , <i>mupA</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X316 | <i>S. epidermidis</i> | HSP | Sangre | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, G137V, H146R, M156T) | OXA-PEN-AMP-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>vga</i> (A), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X529 | <i>S. epidermidis</i> | HVC | Sangre | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, G139V, H146R, M156T) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-TEI-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (C), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X1758 | <i>S. epidermidis</i> | HAV | Exudado de herida | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, F147L); L4 (in-70G71) | OXA-PEN-AMP-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-MUP-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>vga</i> (A), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X1759 | <i>S. epidermidis</i> | HAV | Catéter venoso | ST2/CC5- <i>SCCmec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T, S214L); L4 (in-70G71) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN-TOB-CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm</i> (A), <i>erm</i> (C), <i>vga</i> (A), <i>aac</i> (6')- <i>le-aph</i> (2'')- <i>la</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |

| Cepa | Especie | Hospital ^a | Muestra | Tipado molecular | CMI linezolid (µg/mL) | Mecanismos de resistencia a linezolid ^b | Resistencia a antibióticos | |
|-------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---|--------------------------|---|---|---|
| | | | | <i>spa</i> -ST/CC- <i>agr</i> - SCC <i>mec</i> | | | Fenotipo ^c | Genotipo |
| X1760 | <i>S. epidermidis</i> | HAV | Catéter venoso | ST2/CC5-SCC <i>mec</i> III | >256 | ARNr 23S (G2576T); L3 (L101V, Q136L, M156T); L4 (in-70G71) | OXA-PEN-AMP-CLI-GEN-TOB- CIP ^{e,j,k} -LEV-CLO-LZD-FUS-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>vga(A)</i> , <i>aac(6')</i> - <i>le</i> - <i>aph(2'')</i> - <i>la</i> , <i>fusB</i> , <i>dfrA</i> |
| X315 | <i>S. hominis</i> | HSP | Sangre | - | 32 | ARNr 23S (G2576T) | OXA-PEN-AMP-ERI-CLI-GEN- TOB-CIP ^{f,i,j,l} -LEV-CLO-LZD-TEI- MUP-SXT | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> , <i>Inu(A)</i> , <i>aac(6')</i> - <i>le</i> - <i>aph(2'')</i> - <i>la</i> , <i>ant(4')</i> - <i>la</i> , <i>mupA</i> , <i>dfrG</i> |

^aHSP, Hospital San Pedro; HRV, Hospital Royo Villanova; HAV, Hospital Arnau de Vilanova; HVC, Hospital Verge de la Cinta.

^bEntre paréntesis se describen las mutaciones, cambios aminoacídicos, deleciones (del) o inserciones (in) detectadas.

^ci, resistencia intermedia.

^dCambio aminoacídico S84L en la proteína GyrA.

^eCambio aminoacídico S84Y en la proteína GyrA.

^fCambio aminoacídico S84F en la proteína GyrA.

^gCambio aminoacídico E84K en la proteína GyrA.

^hCambio aminoacídico A457T en la proteína GyrA.

ⁱCambio aminoacídico S80F en la proteína GrIA.

^kCambio aminoacídico D84Y en la proteína GrIA.

^lCambio aminoacídico G84D en la proteína GrIA.

^mCambio aminoacídico Y410F en la proteína GrIA.

Mediante el mapeo por PCR se pudo determinar que en la cepa X1761 los genes *cfr* y *fexA* formaban parte de la variante del Tn558 descrita en el plásmido pSCFS3 de *S. aureus* (GenBank AM086211), donde el gen *cfr* se encuentra flanqueado por la secuencia de inserción IS21-558 (**Figura 23**). El alineamiento del entorno genético del gen *cfr* de la cepa X1761 y la variante del Tn558 del plásmido pSCFS3 reveló la presencia de seis cambios nucleotídicos en la región no codificante aguas arriba del elemento IS21-558. El gen *cfr* se transfirió por conjugación al mutante resistente a rifampicina de *S. aureus* ATCC® 29213, junto con el gen *fexA*. Los transconjugantes mostraron sensibilidad reducida a clindamicina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid (**Tabla 65**).

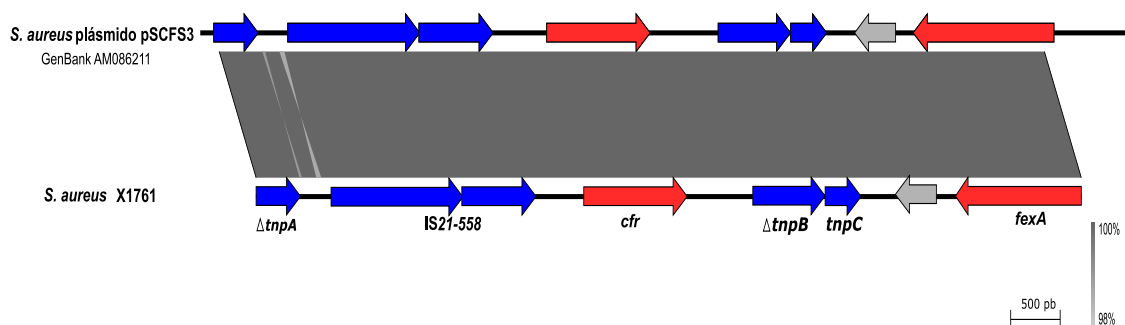


Figura 23. Comparación BLAST del entorno genético del gen *cfr* en la cepa X1761 de origen clínico y la secuencia de referencia del plásmido pSCFS3 de *S. aureus* (GenBank AM086211).

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; azul, recombinación y transposición; gris, función desconocida.

El análisis del genoma completo de la cepa *S. aureus* C9026 permitió identificar el gen *cfr*, en combinación con *fexA*, en un plásmido de 38 864 pb, previamente descrito en la cepa clínica *S. epidermidis* 12-02300 (GenBank KM521837) (**Figura 24**). En el plásmido detectado, además de *cfr* y *fexA*, no se encontraron otros genes de resistencia a antibióticos. La única diferencia que se encontró entre ambos plásmidos fue el cambio aminoacídico D184Y en una proteína hipotética. Dentro de este plásmido, el gen *cfr* se localizaba junto con el gen *fexA* en una variante del Tn558 previamente descrita en el plásmido pSCFS7 de *S. aureus* (GenBank FR675942). El plásmido se consiguió transferir al mutante resistente a rifampicina de *S. aureus* ATCC® 29213 por conjugación. Los transconjugantes (TC) presentaron resistencia a clindamicina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid (**Tabla 63**).

Tabla 63. Genotipo de resistencia a antibióticos y CMI a clindamicina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid de la cepa receptora, las cepas dadoras y los respectivos transconjugantes.

| Cepa | Genotipo de resistencia | CMI (μg/mL) | | | |
|------------------------------|--|--------------|-----|------|-----|
| | | CLI | CLO | FFN | LZD |
| <i>S. aureus</i> ATCC® 29213 | - | 0.12 | 4 | 4 | 2 |
| <i>S. aureus</i> X1761 | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>ant(4')-Ia</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>cfr</i> , <i>fexA</i> | >128 | 128 | ≥256 | 8 |
| X1761-TC | <i>cfr</i> , <i>fexA</i> | >128 | 128 | 128 | 8 |
| <i>S. aureus</i> C9026 | <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>msr(A)</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>cfr</i> , <i>fexA</i> , <i>fosD</i> | 64 | 128 | 512 | 16 |
| C9026-TC | <i>cfr</i> , <i>fexA</i> | 32 | 128 | 256 | 8 |

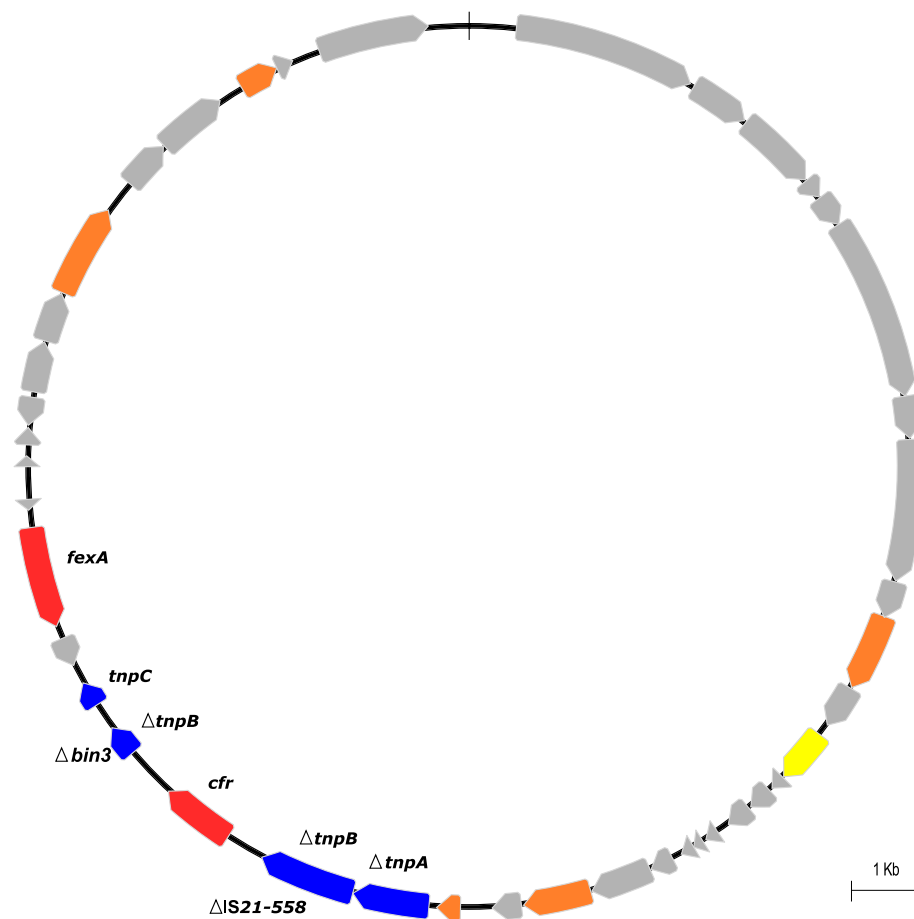


Figura 24. Plásmido de 38 864 pb detectado en la cepa *S. aureus* C9026 de origen clínico, donde se localizan los genes *cfr* y *fexA*.

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; azul, recombinación y transposición; amarillo, replicación; naranja, función conocida; gris, función desconocida.

2.3. *Enterococcus* spp. LZD^R de muestras de aire de granjas porcinas

Entre las cepas de otros géneros bacterianos que se aislaron de la granja porcina PI se detectaron dos cepas *E. faecium* LZD^R (CMI 8 µg/mL). Estas cepas fueron aisladas del aire del interior de la granja (*E. faecium* C10004) y del aire a 150m de la granja (*E. faecium* C10009). Las cepas *E. faecium* C10004 y *E. faecium* C10009, que fueron tipadas como ST128 y ST437, respectivamente, albergaban los genes de resistencia a linezolid *poxtA* y *optrA*. No se detectaron mutaciones en el dominio V del ARNr 23S, ni cambios aminoacídicos en los genes codificantes de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22. Mostraron resistencia a cloranfenicol (CMI 32 µg/mL) y florfenicol (CMI 64 µg/mL), y ambas portaban el gen de resistencia a fenicoles *fexB*, y la cepa C10004 también el gen *fexA* (Tabla 64).

Tabla 64. Características de las cepas *E. faecium* C10004 y C10009 LZD^R aisladas del aire de la granja PI.

| Cepa | MLST | Fenotipo de resistencia | Genotipo de resistencia |
|--------|-------|---|---|
| C10004 | ST128 | PEN ^a -AMP-ERI-CLI-QDA-GEN-TOB-TET-CIP ^l -FFN-CLO-LZD-FUS | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aac(6')-Ii</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> , <i>fexB</i> , <i>optrA</i> , <i>poxtA</i> |
| C10009 | ST437 | PEN ^b -AMP-ERI-CLI-QDA-GEN-TOB-TET-CIP-LEV ^l -FFN-CLO-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aac(6')-Ii</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexB</i> , <i>optrA</i> , <i>poxtA</i> , <i>dfrG</i> |

^aCambios aminoacídicos detectados en la PBP5: G66E, A68T, E85D, E100Q, K144Q, T127A, L177I, D204G, A216S, T324A, M486T, N496K, A499T, E525D, L563I, E629V y D644N.

^bCambios aminoacídicos detectados en la PBP5: V24A, S27G, R34Q, G66E, E100Q, K144Q, T127A, L177I, A216S, T324A, N496K, A499I y E525D.

En lo que respecta al perfil de resistencia a antibióticos, ambos aislados *E. faecium* fueron multiresistentes, pero se encontraron diferencias en la sensibilidad a quinolonas, ácido fusídico y trimetoprim-sulfametoxazol. Presentaron resistencia de alto nivel a antibióticos β-lactámicos y se detectaron múltiples cambios aminoacídicos en la PBP5, en comparación con la cepa de referencia (Tabla 64). Las dos cepas *E. faecium* albergaban diferentes genes que confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglucósidos y tetraciclina. La cepa *E. faecium* C10009 era resistente a fluoroquinolonas y la cepa C10004 mostró un fenotipo de resistencia intermedia, pero no se detectó en ninguna de las dos cepas mutaciones en las QRDRs. Ambas cepas fueron sensibles a antibióticos como la vancomicina, fosfomicina y daptomicina, entre otros.

El análisis por secuenciación masiva del genoma de la cepa C10009 reveló que portaba la variante salvaje del gen *poxtA*, con una identidad nucleotídica del 100% respecto al gen descrito en la cepa *S. aureus* AUOC-0915 (GenBank MF095097), mientras que C10004 portaba una variante de *PoxTA* con el cambio aminoacídico I219L. El alineamiento nucleotídico y aminoacídico del entorno genético de *poxtA* fue idéntico en las cepas C10004 y C10009 (GenBank MN661250), donde se detectó la secuencia de inserción IS1216, dos regiones de 378 y 272 pb codificantes de proteínas con función desconocida y el gen *fexB* localizado aguas abajo de *poxtA* (Figura 25).

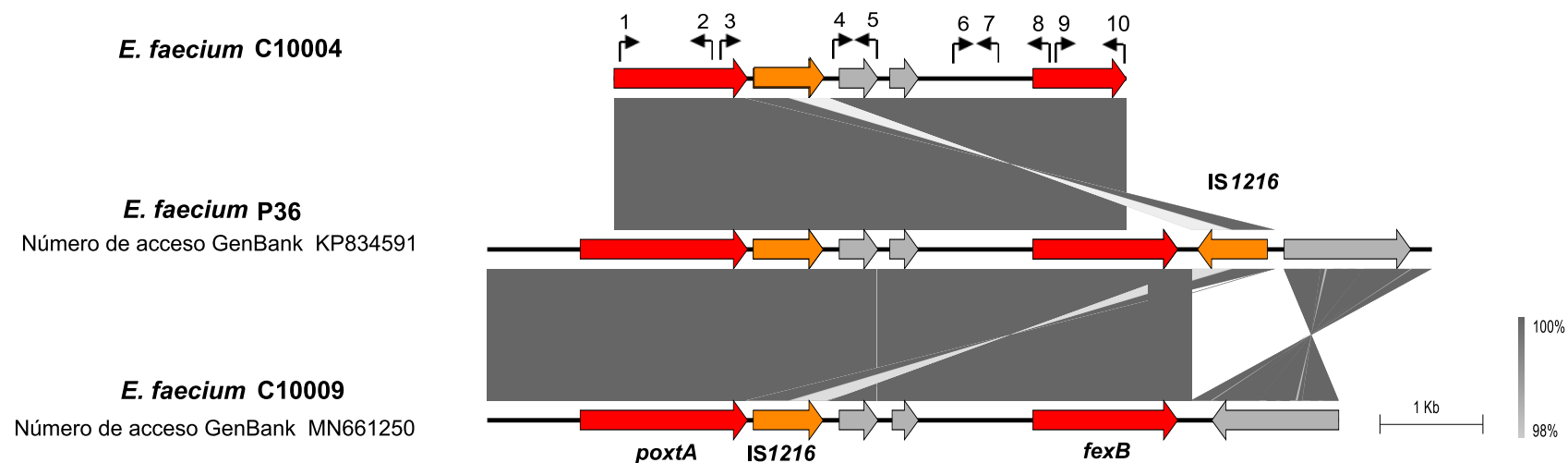


Figura 25. Comparación BLAST del entorno genético del gen *poxtA* identificado en los aislados *E. faecium* C10004 y *E. faecium* C10009 (GenBank MN661250) procedentes del aire de la granja porcina PI y la secuencia de referencia de *E. faecium* P36 (GenBank KP834591).

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; naranja, transposición; gris, función desconocida. La dirección y posición aproximada de los cebadores usados para determinar el entorno genético del gen *poxtA* en la cepa C10004 están indicados mediante flechas: 1, *poxtA*-F; 2, *poxtA*-R; 3, *poxtA*-inv; 4, *poxtA*-reg1; 5, *poxtA*-reg2; 6, *poxtA*-reg3; 7, *poxtA*-reg4; 8, *poxtA*-reg5; 9, *fexB*-F; 10, *fexB*-R (Tabla 46).

El alineamiento del entorno genético de estas cepas y la secuencia de referencia *E. faecium* P36 (GenBank KP834591) mostró la presencia de una segunda copia de la secuencia de inserción IS1216 (flanqueando el transposón Tn6246) aguas abajo del gen *fexB* en la cepa *E. faecium* P36 que estaba ausente en la cepa *E. faecium* C10009 (**Figura 25**). En la cepa C10004, el entorno genético amplificado por PCR no fue suficientemente largo como para identificar la presencia o ausencia de esa segunda copia de la secuencia de inserción.

En relación con el gen *optrA*, ambas cepas portaban la variante salvaje de OptrA descrita en *E. faecalis* E394 (GenBank KP399637). Mediante el análisis por secuenciación masiva de la cepa C10009 y debido a la longitud de la secuencia, solo se pudo determinar la presencia de una región codificante de una proteína con función desconocida aguas arriba del gen *optrA*.

En gen *optrA* no se pudo transferir a la cepa *E. faecalis* JH2-2 mediante conjugación, pero se obtuvieron transconjugantes de las cepas *E. faecium* C10004 (TC-C10004) y C10009 (TC-C10009) portadores de los genes *poxtA* y *fexB*. Además, la cepa TC-C10004 también albergaba los genes de resistencia a tetraciclina *tet(L)* y *tet(M)* (**Tabla 65**). Se detectó un incremento de dos a tres y de cuatro diluciones en las CMI de cloranfenicol y florfenicol de los transconjugantes, respectivamente. En el caso del linezolid, el incremento fue de solamente una dilución. Para la tetraciclina, en la cepa TC-C10009 el incremento de CMI fue de una dilución en comparación con la cepa receptora, mientras que para TC-C10004, que además portaba los genes *tet(L)* y *tet(M)*, la CMI fue igual a la de la cepa dadora (**Tabla 65**).

Tabla 65. Genotipo de resistencia y CMI a tetraciclina, cloranfenicol, florfenicol y linezolid de la cepa receptora, las cepas dadoras y los respectivos transconjugantes.

| Cepa | Genotipo de resistencia | CMI (µg/mL) | | | |
|--------------------------|---|-------------|-----|-----|-----|
| | | TET | CLO | FFN | LZD |
| <i>E. faecalis</i> JH2-2 | - | 0.125 | 4 | 4 | 2 |
| <i>E. faecium</i> C10004 | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> , <i>fexB</i> , <i>optrA</i> , <i>poxtA</i> | 256 | 32 | 64 | 8 |
| TC-C10004 | <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexB</i> , <i>poxtA</i> | 256 | 16 | 64 | 4 |
| <i>E. faecium</i> C10009 | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aph(3')-III</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexB</i> , <i>optrA</i> , <i>poxtA</i> , <i>dfpG</i> | 256 | 32 | 64 | 8 |
| TC-C10009 | <i>fexB</i> , <i>poxtA</i> | 0.25 | 32 | 64 | 4 |

2.4. *Enterococcus* spp. LZD^R de origen clínico

En este trabajo se han caracterizado 19 aislados clínicos de *Enterococcus* LZD^R (13 *E. faecalis* y 6 *E. faecium*) (**Tabla 66** y **Tabla 67**). Las 13 cepas de *E. faecalis* LZD^R presentaron valores de CMI a linezolid de 4-16 µg/mL. El gen *optrA* se detectó en todas las cepas (n=13) y una de ellas (X528) también portaba el gen *cfr(D)*.

Tabla 66. Caracterización de los 13 *E. faecalis* LZD^R procedentes de hospitales españoles.

| Cepa | Hospital ^a | Muestra | MLST/CC | CMI a linezolid (µg/mL) | Mecanismos de resistencia a linezolid ^b | Resistencia a antibióticos | |
|-------|-----------------------|----------------|-----------|----------------------------|---|---|--|
| | | | | | | Fenotipo | Genotipo |
| C9884 | HSJ | Orina | ST585/CC4 | 12 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^c -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |
| C8946 | HUG | Exudado herida | ST480 | 16 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |
| C9901 | HUG | Orina | ST21/CC21 | 12 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-KAN-STR-TET-CLO-FFN-LZD-TDZ | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> |
| C9951 | HSP | Orina | ST16 | 8 | <i>optrA</i> (Y176D, T481P); ARNr 23S (G2576T) | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(A)</i> -tipo, <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |
| C9952 | HSP | Orina | ST35 | 8 | <i>optrA</i> (Y176D, T481P) | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^{c,e} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ | <i>erm(A)</i> -tipo, <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> |
| C9736 | HVC | Orina | ST585/CC4 | 16 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^c -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |
| C9737 | HVC | Orina | ST896 | 16 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-KAN-STR-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>cat_{PC221}</i> |
| X523 | HVC | Exudado ótico | ST480 | 8 | <i>optrA</i> (T572P); L4 (V109A) | ERI-CLI-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |

| Cepa | Hospital ^a | Muestra | MLST/CC | CMI a linezolid (µg/mL) | Mecanismos de resistencia a linezolid ^b | Resistencia a antibióticos | |
|------|-----------------------|---------|-----------|----------------------------|---|---|--|
| | | | | | | Fenotipo | Genotipo |
| X524 | HVC | Orina | ST480 | 8 | <i>optrA</i> ; L4 (A104V) | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |
| X525 | HVC | Úlcera | ST585/CC4 | 8 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^c -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>catA</i> , <i>dfrG</i> |
| X526 | HVC | Orina | ST896 | 4 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-KAN-STR-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>cat_{pC221}</i> |
| X527 | HVC | Úlcera | ST6/CC2 | 16 | <i>optrA</i> | ERI-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFN-LZD-TDZ | <i>erm(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> |
| X528 | HVC | Absceso | ST480 | 12 | <i>optrA</i> ; <i>cfr(D)</i> | ERI-CLI-KAN-STR-TET-CIP ^{c,d} -LEV-CLO-FFC-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>cfr(D)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> |

^aHSJ, Hospital San Jorge; HUG, Hospital Universitario de Getafe; HSP, Hospital San Pedro; HVC, Hospital Verge de la Cinta

^bEntre paréntesis se describen las mutaciones y cambios aminoacídicos detectados.

^cCambio aminoacídico S80I en la proteína ParC.

^dCambio aminoacídico S83Y en la proteína GyrA.

^eCambio aminoacídico S80I en la proteína GyrA.

Tabla 67. Caracterización de los seis *E. faecium* LZD^R procedentes de hospitales españoles.

| Cepa | Hospital ^a | Muestra | Patrón PFGE | MLST/CC | CMI a linezolid (µg/mL) | Mecanismos de resistencia a linezolid ^b | Resistencia a antibióticos | |
|--------|-----------------------|-------------------|-------------|------------|-------------------------|--|---|--|
| | | | | | | | Fenotipo ^c | Genotipo |
| C9902 | HLB | Absceso | A | ST117/CC17 | 8 | ARNr 23S (G2576T); L22 (A35T) | PEN ^d -AMP-ERI-CLI-TOB-KAN-STR-CIP ^g -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msrC</i> , <i>aac(6')</i> -II, <i>aph(3'')</i> -III, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>dfrG</i> |
| C9903 | HLB | Herida quirúrgica | B | ST262/CC17 | 16 | ARNr 23S (G2576T) | PEN ^d -AMP-ERI-CLI-GEN-TOB-KAN-STR-TET-CIP ^g -LEV-LZD-SXT | <i>msrC</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')</i> -aph(2''), <i>aac(6')</i> -II, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>dfrG</i> |
| C10262 | HLB | Sangre | C | ST117/CC17 | 32 | ARNr 23S (G2576T) | PEN ^e -AMP-ERI-CLI-TOB-KAN-STR-CIP ^g -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msrC</i> , <i>aac(6')</i> -II, <i>aph(3'')</i> -III, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>dfrG</i> |
| C9950 | HSP | Sangre | D | ST117/CC17 | 4 | ARNr 23S (G2576T) | PEN ^f -AMP-ERI-CLI-KAN-STR-CIP ^g -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msrC</i> , <i>aac(6')</i> -II, <i>aph(3'')</i> -III, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>dfrG</i> |
| C9953 | HSP | Orina | E | ST117/CC17 | 12 | ARNr 23S (G2576T) | PEN ^{l,d} -AMP-ERI-CLI-KAN-STR-CIP ^g -LEV-LZD-FOS-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msrC</i> , <i>aac(6')</i> -II, <i>aph(3'')</i> -III, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>dfrG</i> |
| C10269 | HRV | Herida quirúrgica | F | ST117/CC17 | 12 | ARNr 23S (G2576T); L22 (A35T) | PEN ^e -AMP-ERI-CLI-TOB-KAN-STR-CIP ^g -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msrC</i> , <i>aac(6')</i> -II, <i>aph(3'')</i> -III, <i>ant(6)</i> -Ia, <i>dfrG</i> |

^aHLB, Hospital Lozano Blesa; HSP, Hospital San Pedro; HRV, Hospital Royo Villanova.

^bEntre paréntesis se describen las mutaciones y cambios aminoacídicos detectados.

^cl, resistencia intermedia.

^dCambios aminoacídicos detectados en la PBP5: G66E, A68T, E85D, E100Q, K144Q, T172A, L177I, D204G, A216S, T324A, V462A, inserción 466S, M485A, N496K, A499T, E525D, N546T, A558T, G582S, E629V, K632Q, P642L, D644N, and P667S.

^eCambios aminoacídicos detectados en la PBP5: G66E, A68T, E85D, E100Q, K144Q, T172A, L177I, D204G, A216S, T324A, inserción 466S, M485A, N496K, F497I, A499T, E525D, N546T, A558T, G582S, E629V, K632Q, P642L, D644N, and P667S.

^fCambios aminoacídicos detectados en la PBP5: G66E, E85D, E100Q, K144Q, T172A, L177I, D204G, A216S, T324A, V462A, inserción 466S, M485A, N496K, A499T, E525D, N546T, A558T, G582S, E629V, K632Q, P642L, D644N, and P667S.

^gCambios aminoacídicos S80I y S83Y en las proteínas ParC y GyrA, respectivamente.

Además, se identificó la mutación G2576T en el dominio V del ARNr 23S en una cepa *optrA*-positiva, y el cambio aminoacídico V109A o A114V en el gen codificante de la proteína ribosomal L4 en dos aislados *E. faecalis* (**Tabla 66**). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de OptrA de las cepas *E. faecalis* LZD^R de este estudio con la secuencia de referencia original descrita en *E. faecalis* E349 (GenBank KP399637), reveló la presencia de diferentes variantes de OptrA: variante salvaje (n=10), Y176D y T481P (n=2), y T572P (n=1) (**Tabla 66**). La proteína Cfr(D) mostró una identidad aminoacídica del 100% con la detectada en *E. faecium* 15-307-1 (GenBank MG707078). Entre las cepas *E. faecalis* LZD^R no se detectó la presencia de los genes *cfr*, *cfr(B)* o *poxtA*.

Por otro lado, los seis aislados *E. faecium* presentaron CMI a linezolid entre 4 y 32 µg/mL. Se detectó la mutación G2576T en el ARNr 23S en todas las cepas *E. faecium* y, además, dos de ellas presentaron el cambio aminoacídico A35T en la secuencia del gen codificante de la proteína ribosomal L22 (**Tabla 67**). No se detectaron los genes de resistencia a *optrA*, *poxtA*, *cfr*, *cfr(B)* y *cfr(D)* entre las cepas *E. faecium* LZD^R.

Los 13 *E. faecalis* LZD^R pertenecían a las secuencias tipo ST480 (n=4), ST585 (n=3), ST6 (n=1), ST16 (n=1), ST21 (n=1), ST35 (n=1) y al nuevo ST896 (n=2) (**Tabla 66**). La **Figura 26** muestra la relación filogenética de los 13 aislados *E. faecalis*, basada en el análisis de SNPs obtenida por secuenciación masiva. La mínima y máxima diferencia de SNPs detectada fue de 11 y 16 567, respectivamente. Las cepas C9737 y X526, que pertenecían a la nueva secuencia tipo ST896 y fueron aisladas en el mismo hospital, mostraron la diferencia mínima de SNPs y fueron agrupadas en un clúster muy distante al resto. Las cepas pertenecientes al ST480 y ST585 fueron agrupadas en dos clústeres filogenéticos diferenciados.

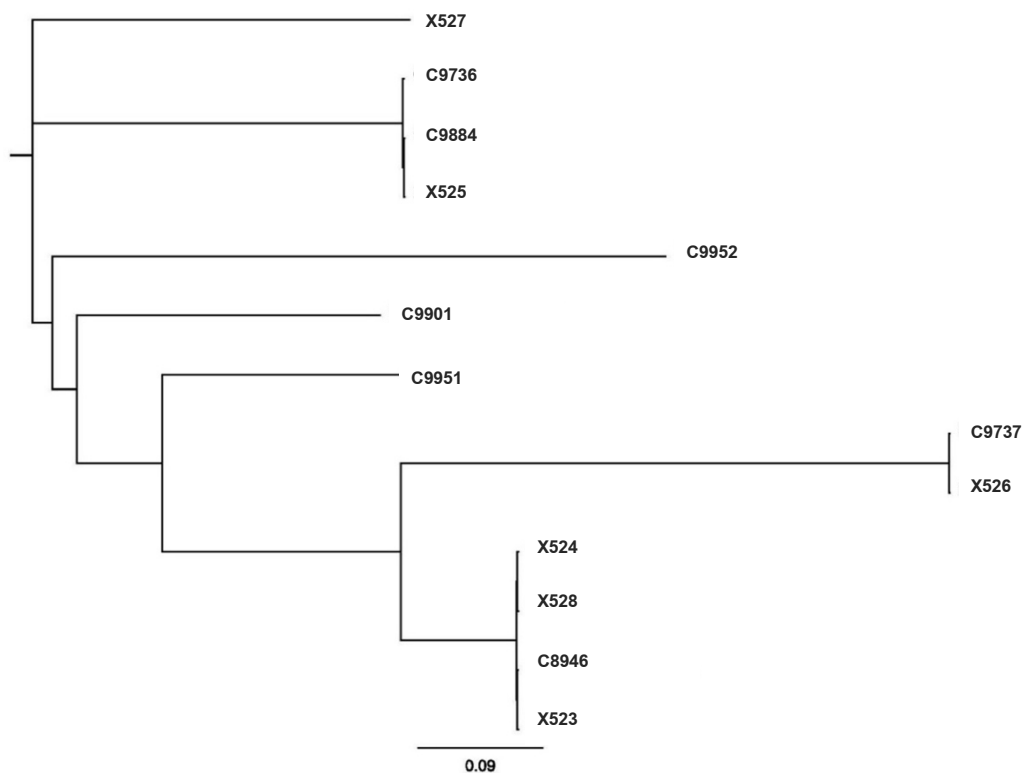


Figura 26. Relación filogenética de las 13 cepas clínicas de *E. faecalis* LZD^R basada en el análisis de SNPs, usando CSI Phylogeny.

La escala indica el número de sustituciones por sitio. La cepa de referencia *E. faecalis* ATCC[®] 29212 no se incluyó en el árbol filogenético.

Cuatro de las seis cepas *E. faecium* fueron tipadas como ST117, y el resto como ST17 o ST262 (**Tabla 67**). El análisis del patrón de PFGE reveló que todas las cepas pertenecían a diferentes clones (A a F).

Todos los enterococos LZD^R presentaron un perfil de multiresistencia, pero fueron sensibles a vancomicina, teicoplanina y daptomicina, entre otros (**Tabla 66 y Tabla 67**). Las cepas *E. faecium* LZD^R mostraron resistencia a penicilina y ampicilina y se detectaron numerosos cambios aminoacídicos en la secuencia de la PBP5 (**Tabla 67**). Todos los enterococos fueron resistentes a macrólidos y lincosamidas y se detectaron diferentes combinaciones de los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *msr(C)*, *lnu(B)*, *lsa(A)* y *lsa(E)*. Todas las cepas *E. faecium* y 12 *E. faecalis* fueron resistentes a al menos un antibiótico aminoglucósido y entre ellas se identificaron los genes *aac(6')-aph(2'')*, *aac(6')-II*, *aph(3')-III*, *ant(6)-Ia* y/o *str*. Se encontró resistencia a tetraciclina en todas las cepas *E. faecalis* y una *E. faecium* mediada por los genes *tet(L)*, *tet(M)* y/o *tet(O)*. Se detectaron cambios aminoacídicos en las proteínas GyrA (S83Y o S83I) y/o ParC (S80Y) en las cepas resistentes a fluoroquinolonas. Todas las cepas *E. faecalis* LZD^R mostraron resistencia a florfenicol (CMI 32-64 µg/mL) y cloranfenicol (CMI 32-128 µg/mL) y eran portadoras del gen *fexA*. También se detectaron entre las cepas *E. faecalis* los genes de resistencia a cloranfenicol *catA* y *cat_{pC221}*. Por el contrario, todas las cepas *E. faecium* fueron sensibles a cloranfenicol y florfenicol. La resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol estaba mediada por el gen *dfpG* (**Tabla 66 y Tabla 67**).

La alineación de la secuencia nucleotídica del entorno del gen de resistencia a linezolid *optrA* en las 13 cepas *E. faecalis* obtenido por secuenciación masiva se muestra en la **Figura 27**. El entorno mostró diferentes grados de identidad entre las cepas, aunque en algunos aislados solo se pudo detectar una pequeña parte de las secuencias flanqueantes del gen *optrA*. La región aguas arriba de *optrA* mostró un alto grado de similitud en las cepas C9901 (GenBank MN848142), X527, X528, C9952 (GenBank MN731744), C8946, C9736 y C9884, aunque fueron aisladas en diferentes hospitales. En las cepas C9901, X527, X528 y C9952, se detectó el gen *tnp* codificante de una transposasa de la familia ISL3 y el gen *impB* que está involucrado en la reparación del ADN, aguas arriba del gen *optrA*. En la cepa X526 (GenBank MN731743), se detectó una recombinasa sitio-específica. El gen *fexA* se identificó aguas arriba del gen *optrA* en 12 cepas, aunque en las cepas X523 y C9737, el gen *fexA* no pudo revelarse completamente. Además, en dos cepas aisladas en el mismo hospital se detectó un gen *erm(A)*-tipo aguas abajo del gen *optrA*. Este gen *erm(A)*-tipo presentó una identidad nucleotídica del 100% con el identificado en el clúster de *optrA* en el plásmido p10-2-2 de *E. faecalis* 10-2-2 (número de acceso GenBank KT862775). No se encontró ningún gen *rep* o secuencia de inserción en el entorno genético de las 13 cepas *E. faecalis*.

En relación con el entorno del gen *cfr(D)*, se pudo identificar la presencia del gen *guaA*, que codifica una guanosa monofosfato sintasa, aguas abajo (**Figura 28**). Aguas arriba del gen *cfr(D)*, debido a la corta longitud de la secuencia, solo se detectaron 3 marcos de lectura para proteínas con función desconocida. Las 4545 pb del entorno genético del gen *cfr(D)* mostraron 100% de identidad nucleotídica con un plásmido de *E. faecium* E8014 (GenBank LR135354).

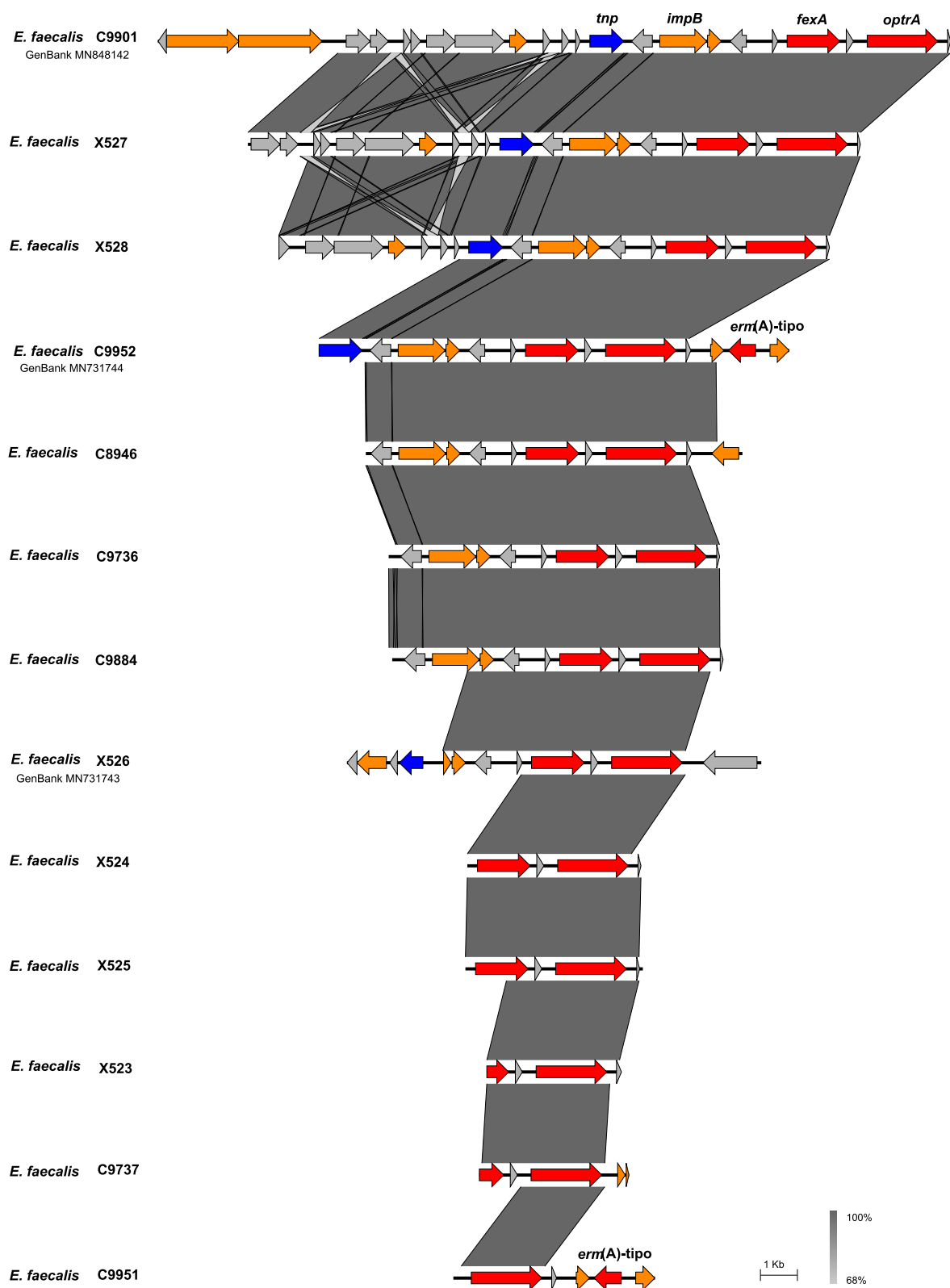


Figura 27. Comparación BLAST del entorno genético del gen *oprA* en las 13 cepas clínicas de *E. faecalis* LZR^R.

A la derecha se muestra la escala y la leyenda de porcentaje de identidad. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función; rojo, resistencia a antibióticos; azul, recombinación y transposición; naranja, función conocida; gris, función desconocida.

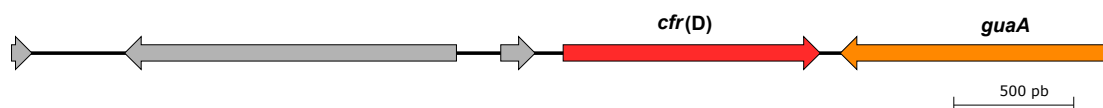


Figura 28. Entorno genético del gen *cfr(D)* en la cepa *E. faecalis* X528 de origen clínico.

A la derecha se muestra la escala. Los CDs están coloreados de acuerdo con su función: rojo, resistencia a antibióticos; naranja, función conocida; gris, función desconocida.

El gen *optrA* no se pudo transferir mediante transformación por electroporación, pero si se transfirió por conjugación a la cepa *E. faecalis* JH2-2 en 12 de los 13 aislados; la única cepa para la que no se transfirió el gen *optrA* fue C8946. El gen *optrA* se transfirió en todos los casos junto con el gen *fexA* (**Tabla 68**). Los transconjugantes mostraron resistencia a cloranfenicol (CMI 32-64 µg/mL), florfenicol (CMI 32-64 µg/mL), tedizolid (CMI 1 µg/mL), y resistencia o resistencia intermedia a linezolid (CMI 4-8 µg/mL). Además, los transconjugantes TC-C9951 y TC-C9952 mostraron resistencia a eritromicina (CMI 128-256 µg/mL) y clindamicina (CMI >256 µg/mL), y portaban un gen *erm(A)*-tipo. El transconjugante TC-9951 también presentó resistencia a tetraciclina y albergaba los genes *tet(L)* y *tet(O)* (CMI 128 µg/mL) (**Tabla 68**). El gen *cfr(D)* no pudo ser transferido.

Tabla 68. Genotipo de resistencia a antibióticos y CMI de la cepa receptora, las cepas dadoras y los respectivos transconjugantes.

| Cepa | Genotipo de resistencia | CMI (µg/mL) | | | | | | |
|-----------------------------|--|-------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | ERI | CLI | TET | CLO | FFN | LZD | TDZ |
| <i>E. faecalis</i> JH2-2 | - | 1 | 2 | 0.125 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| C9884 | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfgG</i> | >256 | 256 | 128 | 64 | 64 | 12 | 1 |
| TC-C9884 | <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| C9901 | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | >256 | >256 | >256 | 32 | 64 | 12 | 1 |
| TC-C9901 | <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| C9951 | <i>erm(A)</i> -tipo, <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfgG</i> | >256 | >256 | 128 | 64 | 64 | 8 | 1 |
| TC-C9951 | <i>erm(A)</i> -tipo, <i>tet(L)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | 256 | >256 | 128 | 64 | 64 | 4 | 1 |
| C9952 | <i>erm(A)</i> -tipo, <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | 256 | >256 | >256 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| TC-C9952 | <i>erm(A)</i> -tipo, <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | 128 | >256 | 0,125 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| C9736 | <i>erm(B)</i> , <i>Inu(B)</i> , <i>Isa(A)</i> , <i>Isa(E)</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfgG</i> | >256 | 128 | 256 | 128 | 32 | 16 | 1 |

| Cepa | Genotipo de resistencia | CMI (µg/mL) | | | | | | |
|----------|--|-------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | ERI | CLI | TET | CLO | FFN | LZD | TDZ |
| TC-C9736 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 64 | 32 | 8 | 1 |
| C9737 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aph(3'')-III, ant(6)-la, tet(M), optrA, fexA, cat_{pC221}</i> | >256 | 128 | 128 | 32 | 64 | 16 | 1 |
| TC-C9737 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 32 | 8 | 1 |
| X523 | <i>lsa(A), lsa(E), tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | 128 | >256 | 128 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| TC-X523 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| X524 | <i>erm(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-la, tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | 256 | 256 | 256 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| TC-X524 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| X525 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-la, str, tet(M), tet(L), optrA, fexA, catA, dfrG</i> | >256 | 128 | 128 | 64 | 64 | 8 | 1 |
| TC-X525 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 32 | 8 | 1 |
| X526 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aph(3'')-III, ant(6)-la, tet(M), optrA, fexA, cat_{pC221}</i> | >256 | 128 | 128 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| TC-X526 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| X527 | <i>erm(B), lsa(A), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-la, tet(M), optrA, fexA</i> | >256 | 256 | 128 | 32 | 64 | 16 | 1 |
| TC-X527 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| X528 | <i>erm(B), lsa(A), aph(3'')-III, ant(6)-la, tet(M), tet(L), cfr(D), optrA, fexA, dfrG</i> | >256 | >256 | >256 | 32 | 64 | 12 | 1 |
| TC-X528 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0,125 | 32 | 64 | 8 | 1 |

3. Factores en virulencia de *Staphylococcus* spp. de diferentes orígenes

Por último, quisimos determinar si los 244 estafilococos caracterizados de los diferentes orígenes y pertenecientes a especies de ScoP (*S. aureus*, 44; *S. delphini*, 12; *S. pseudintermedius*, 28), y a diferentes especies de SCoN (n=260), eran portadores de genes de virulencia de relevancia clínica y si las especies de SCoN podían contener genes de virulencia normalmente asociados a *S. aureus*.

En la **Tabla 69** se incluye el número de estafilococos detectados que portaban los genes codificantes de factores de virulencia investigados en esta tesis. Cabe destacar que entre las cepas *S. aureus* pertenecientes a los linajes SARM-AG CC398 y CC9 caracterizadas en esta tesis, no se encontró ninguno de los factores de virulencia estudiados.

Tabla 69. Genes codificantes de factores de virulencia identificados en las 244 cepas de *Staphylococcus* spp. de diferentes orígenes.

| Gen | Cepas positivas (%) | | | |
|-----------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|---------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. pseudintermedius</i> | <i>S. delphini</i> | SCoN |
| <i>scn</i> | 6 (13,6) | 0 | 0 | 0 |
| <i>scneq</i> | 1 (2,3) | 0 | 0 | 0 |
| <i>lukS-FIPV</i> | 1 (2,3) | 0 | 0 | 1 (0,4) |
| <i>lukPQ</i> | 1 (2,3) | 0 | 0 | 0 |
| <i>tst</i> | 0 | 0 | 0 | 2 (0,8) |
| <i>eta</i> | 0 | 0 | 0 | 3 (1,2) |
| <i>etb</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>etd</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>etd2</i> | 7 (16) | 0 | 0 | 0 |
| <i>lukS-I</i> | - | 28 (100) | 12 (100) | - |
| <i>lukF-I</i> | - | 28 (100) | 2 (16,7) | - |
| <i>siet</i> | - | 28 (100) | 12 (100) | - |
| <i>se-int</i> | - | 28 (100) | 12 (100) | - |
| <i>expA</i> | - | 0 | 0 | - |
| <i>expB</i> | - | 2 (7,1) | 0 | - |
| <i>sec_{canine}</i> | - | 2 (7,1) | 0 | - |

Sistema IEC

Entre las cepas de esta tesis, el gen *scn*, considerado el marcador de la presencia del sistema IEC, se detectó en el 13,6% de las cepas de la especie *S. aureus* (Tabla 69). Ninguno de los aislados SCoN o pertenecientes al SIG portaban el gen *scn*.

El IEC tipo E, que contiene los genes *scn* y *sak*, se identificó en dos cepas SARM portadoras del gen *mecC* y en una cepa SASM, todas ellas procedentes de muestras traqueales de aves de silvestres (Tabla 70). Además, otra cepa SARM-*mecC* del mismo origen portaba el gen *sak* pero no el gen *scn* por lo que se consideró IEC negativa (Tabla 70). En las cepas con el IEC tipo E se detectaron integrasas de la familia Sa3int. Dos cepas SASM aisladas de infecciones de animales de compañía y tipadas como t045-ST5/CC5-*agrII* eran portadoras de los genes del IEC tipo F (*scn*, *chp*, *sak*, *sep*) (Tabla 70). La cepa SASM C9906 LZD^R de origen clínico y tipada como t1688-ST123-*agrIV*, presentaba el IEC tipo E y se identificaron integrasas de tipo 3 (Tabla 70).

Por otro lado, la variante del SCIN adaptada a equinos (*scneq*) estuvo presente en un aislado SASM t10576-ST1660-*agrII*, procedente de una muestra clínica de perro (Tabla 70).

Leucocidinas

Entre las cepas *S. aureus*, solo se identificaron los genes codificantes de la LPV en un aislado SASM t10576-ST1660-*agrII* procedente de una muestra clínica respiratoria de un gato (Tabla 70).

Tabla 70. Factores de virulencia detectados en las cepas de *Staphylococcus* spp. de esta tesis en función su origen, y presencia de genes de integrasas asociadas a fagos.

| Origen | Especie | Número de cepas | Tipado molecular | Factores de virulencia ^a | Integrasas ^b | Cepas |
|--|---|-----------------|---|---|-------------------------|---|
| Muestras traqueales de aves silvestres | <i>S. aureus</i> (SARM- <i>mecC</i>) | 2 | t843-ST1945/CC130- <i>agrIII</i> - <i>SCCmecXI</i> | <i>etd2</i> , IEC tipo E | Sa3int | C9460, C9228 (Tabla 53) |
| | <i>S. aureus</i> (SARM- <i>mecC</i>) | 4 | t1535-ST1945/CC130- <i>agrIII</i> - <i>SCCmecXI</i> | <i>etd2</i> | ND | C9162, C9165, C9169, C9257 (Tabla 53) |
| | <i>S. aureus</i> (SARM- <i>mecC</i>) | 1 | t843-ST1945/CC130- <i>agrIII</i> - <i>SCCmecXI</i> | <i>etd2</i> , <i>sak</i> | NI | C9456 (Tabla 53) |
| | <i>S. aureus</i> (SASM) | 1 | t267-ST97/CC97 | IEC tipo E | Sa3int | C9461 (Tabla 53) |
| | <i>S. delphini</i> | 9 | B | <i>lukS-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C9221, C9242, C9253, C9458, C9459, C9247, C9457, C9237, C9261 (Tabla 54) |
| | <i>S. delphini</i> | 2 | B | <i>lukS/F-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C9455, C918 (Tabla 54) |
| | <i>S. delphini</i> | 1 | A | <i>lukS-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C9243 (Tabla 54) |
| | <i>S. sciuri</i> | 2 | - | <i>tst</i> | ND | C9501, C9503 (Tabla 56, Anexo I) |
| Muestras ambientales de granjas porcinas | <i>S. simulans</i> | 1 | - | <i>lukS/F-PV</i> | Sa2int | X156 (Tabla 59, Anexo II) |
| | <i>S. cohnii</i> | 3 | - | <i>eta</i> | NI | X102, X106, X117 (Tabla 59, Anexo II) |
| Procesos infecciosos de animales de compañía | <i>S. pseudintermedius</i> (SPRM- <i>mecA</i>) | 5 | ST71- <i>agrIII</i> - <i>SCCmecIII</i> | <i>lukS/F-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C3871, C3880, C3885, C5355, C5613 (Tabla 61) |
| | <i>S. pseudintermedius</i> (SPRM- <i>mecA</i>) | 2 | ST68- <i>agrIV</i> - <i>SCCmecV</i> | <i>lukS/F-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C3866, C3870 (Tabla 61) |
| | <i>S. pseudintermedius</i> (SPRM- <i>mecA</i>) | 1 | ST258- <i>agrII</i> - <i>SCCmecIV</i> | <i>lukS/F-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C3869 (Tabla 61) |
| | <i>S. pseudintermedius</i> (SPSM) | 16 | | <i>lukS/F-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> | ND | C5344, C5345, C5360, C5347, C5351, C3881, C5354, C5358, C3875, C5356, C5362, C3873, C3878, C5357, C3874, C5359 (Tabla 61) |
| | <i>S. pseudintermedius</i> (SPSM) | 2 | | <i>lukS/F-I</i> , <i>siet</i> , <i>se-int</i> , <i>expB</i> | ND | C3877, C3876 (Tabla 61) |

| | | | | | | |
|---|---------------------------------------|---|--|--|--------|-------------------------|
| Procesos infecciosos de animales de compañía | <i>S. pseudintermedius</i> (SPSM) | 2 | | <i>lukS/F-I, siet, se-int, sec_{canine}</i> | ND | C5355, C3879 (Tabla 61) |
| | <i>S. aureus</i> (SASM) | 1 | t10576-ST1660- <i>agrII</i> | <i>lukPQ, scneq</i> | ND | C5612 (Tabla 61) |
| | <i>S. aureus</i> (SASM) | 1 | t005-ST22/CC22- <i>agrI</i> | <i>lukS/F-PV</i> | Sa2int | C5650 (Tabla 61) |
| | <i>S. aureus</i> (SASM) | 2 | t045-ST5/CC5- <i>agrII</i> | IEC tipo F | NI | C5610, C5609 (Tabla 61) |
| Cepas clínicas LZD ^R | <i>S. aureus</i> (SARM- <i>mecA</i>) | 1 | t2220-ST125/CC5- <i>agrII</i> SCC <i>mecIV</i> | <i>hlgA, hlgB, hlgC, lukD, luke, seg, sen, aur, splA, splB^c</i> | ND | C9026 (Tabla 64) |
| | <i>S. aureus</i> (SASM) | 1 | t1688-ST123- <i>agrIV</i> | IEC tipo E | Sa3int | C9906 (Tabla 64) |

^aIEC tipo E: *scn, sak*. IEC tipo F: *scn, chp, sak, sep*.

^bND, no determinado; NI, no identificado.

^cGenes detectados por secuenciación completa del genoma.

Además, el gen codificante de la LPV también se detectó en una cepa *S. simulans* aislada de las muestras ambientales de la granja PSE. Ambas cepas portaban integrasas de la familia Sa2int (Tabla 70).

La misma cepa SASM que portaba el gen *scneq* también fue la única cepa que albergaba el gen de la leucocidina *lukPQ*, que actúa frente a los neutrófilos equinos (Tabla 70).

Toxina del síndrome del sock tóxico

El gen codificante de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tst*) no se identificó en ninguna de las cepas *S. aureus* de esta tesis (Tabla 69). Sin embargo, se detectó este factor de virulencia en dos aislados *S. sciuri* procedentes de muestras traqueales de buitre negro (Tabla 70).

Toxinas exfoliativas

No se identificó ninguna cepa de *Staphylococcus* spp. portadora de los genes codificantes de las toxinas exfoliativas ETB y ETD (Tabla 69). Sin embargo, se detectaron tres cepas de la especie *S. cohnii*, procedentes de las muestras ambientales de la granja PI, que portaban el factor de virulencia *eta*. Todas las cepas SARM *mecC* positivas (n=7) portaban el gen *etd2*, que codifica la proteína ETD2, un nuevo alelo de la toxina exfoliativa ETD (Tabla 70).

Factores de virulencia asociados al SIG

En todas las cepas *S. delphini* de muestras traqueales de aves se detectó la toxina exfoliativa *siet*, la enterotoxina *se-int* y la subunidad S de la leucocidina *lukS/F-I*. Dos cepas portaban además la subunidad *lukF-I*. La presencia de *lukS/F-I siet* y *se-int* fue ubicua entre las cepas SPRM y SPSM aisladas de animales de compañía. Además, dos cepas eran portadoras de la enterotoxina *sec_{canine}* y otras dos de la toxina exfoliativa *expB* (Tabla 70).

En la cepa SPSM C5347, que fue sometida a secuenciación completa del genoma, se identificó la leucocidina *lukS/F-I* en un fago integrado en el cromosoma. Los genes *siet* y *se-int* se localizaban en el ADN cromosómico en una zona altamente conservada en comparación con otras cepas de *S. pseudintermedius* depositadas en el GenBank.

Otros factores de virulencia detectados por secuenciación masiva

La secuenciación masiva del genoma de la cepa clínica SARM C9026 LZD^R reveló la presencia de genes codificantes de diferentes factores de virulencia, incluyendo los componentes A, B y C de la hemolisina γ (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*), la leucocidina LukDE (*lukD*, *lukE*), la aureolisina (*aur*), las enterotoxinas SEG y SEN (*seg*, *sen*), y proteasas de serina (*spIA*, *spIB*) (Tabla 70).

Discusión



1. Prevalencia, diversidad de especies, resistencia a antibióticos y líneas genéticas en *Staphylococcus* spp. de diversos orígenes

1.1. *Staphylococcus* spp. de muestras traqueales de aves silvestres

España cuenta con una gran diversidad aviar y es un punto clave para la parada e invernación de muchas aves migratorias procedentes del centro y norte de Europa (Araújo *et al.*, 2007). Esto, unido al continuo aumento de la relación entre animales silvestres, ganado, animales de compañía y humanos, hace que se facilite el intercambio de microorganismos, incluyendo patógenos (Gortázar *et al.*, 2016). Además, las aves son consideradas centinelas, reservorio y posible fuente de diseminación de la resistencia a antibióticos debido a su interacción con la interfaz humana, los diversos nichos ecológicos que ocupan y la capacidad de migrar largas distancias (Bonnedaahl y Järhult, 2014). Por ello, es necesario estudiar la exposición y presencia de bacterias potencialmente patógenas o de interés en salud pública en aves silvestres, con el fin de determinar el riesgo existente y proponer estrategias de prevención. Este estudio representa el trabajo con mayor número de muestras de aves de vida libre analizadas, y proporciona información novedosa sobre la frecuencia, diversidad de especies, fenotipo y genotipo de resistencia, así como contenido en genes de virulencia de estafilococos de fauna silvestre.

Se detectó una presencia moderada de SCoP en las muestras traqueales de aves (8,3%), que varió de forma considerable entre las diferentes especies animales estudiadas. Las tasas más altas de colonización se encontraron en buitre negro (15%) y urraca (5%), mientras que en otras aves no se detectó o fue infrecuente la presencia de SCoP (milano real, ibis eremita, quebrantahuesos, gaviota reidora, alimoche, abejero europeo y aguilucho lagunero). Esta variación puede deberse, al menos en parte, a las diferencias en el número de muestras que se han tomado de cada especie de ave, con una gran cantidad de muestras de buitre negro y urraca y menor número del resto de especies. De hecho, aunque las urracas muestreadas pertenecían a 3 localizaciones diferentes, solo se aisló SCoP de los animales del lugar donde se tomaron el mayor número de muestras. La prevalencia de SCoP detectada es mayor que la que se encontró en aves rapaces en Portugal (6%) (Sousa *et al.*, 2014), pero menor que en otras especies animales como burros (62%) (Gharsa *et al.*, 2015), jabalíes (18%) (Mama *et al.*, 2019b), o palomas silvestres (66%) (Kizerwetter-Świda *et al.*, 2015).

En este trabajo solo se detectaron las especies *S. aureus* y *S. delphini*, mientras que estudios previos encontraron otras especies de SCoP en fauna silvestre, como *S. pseudintermedius*, *S. hycus*, *S. intermedius* o *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (Kizerwetter-Świda *et al.*, 2015; Mama *et al.*, 2019b). Los resultados observados en trabajos anteriores indican que la especie *S. pseudintermedius* coloniza sobre todo a las especies de la familia Canidae (Nowakiewicz *et al.*, 2016), por lo que no resulta extraño la ausencia de *S. pseudintermedius* en las aves estudiadas. La especie *S. intermedius* ha sido considerada durante mucho tiempo la especie de estafilococo predominante en palomas silvestres (Sasaki *et al.*, 2007), por lo que es destacable que no se haya detectado en las muestras de aves analizadas. Sin embargo, estudios más recientes detectaron una mayor prevalencia de *S. delphini* que de *S. intermedius* en aves sanas (Kizerwetter-Świda *et al.*, 2015).

La prevalencia detectada de *S. aureus* en aves silvestres fue baja (4%), con tasas similares en las muestras de buitre negro (6%) y urraca (5%). Teniendo en cuenta que las aves de vida libre no se encuentran bajo la presión selectiva de los antibióticos, es destacable que nueve de los 10 *S. aureus* detectados fueran SARM. En muestras de buitres leonados en España se observó la misma tasa de colonización (5%) por SARM y SASM, mientras que en mamíferos la tasa de colonización por SASM era mucho más elevada que por SARM (Porrero *et al.*, 2014, 2013). Tanto buitres negros como urracas son animales carroñeros, en el caso de la urraca parcialmente. Mientras que la urraca se encuentra a menudo cerca de hábitats humanos, como granjas o parques, los buitres negros se encuentran en hábitats más remotos. Sin embargo, el hallazgo de anillamientos en vertederos y de bolsas de plástico en sus nidos, sugiere que los buitres negros de la colonia que se muestreó están en contacto con desechos y basura de origen humano. Esto puede deberse a que se ha reducido la disponibilidad de recursos alimenticios por la legislación acerca de cadáveres de ganado, que entró en vigor por la aparición de la encefalopatía esponjiforme bovina (Donázar *et al.*, 2009). Tanto los vertederos como las estaciones de alimentación suplementaria reúnen a los animales carroñeros, pudiendo facilitar la transmisión de patógenos una vez que es adquirido por un individuo y, después, los adultos pueden transmitir estas bacterias a su descendencia durante la alimentación en el nido.

El porcentaje de detección de SARM (3,7%) es similar al que se obtuvo en muestras nasales de buitre leonado (5%), pero más alto que los observados en otras especies como jabalí, cabra montesa y ciervo en España (0,3-2%) (Mama *et al.*, 2019b; Porrero *et al.*, 2013). Resulta interesante que ocho de los 10 aislados SARM de nuestro estudio eran portadores del gen *mecC*, y que mostraron una gran homogeneidad de líneas genéticas, teniendo en cuenta que fueron aislados de diferentes especies animales, en diferentes localizaciones geográficas. Todas las cepas *mecC* positivas, excepto una, fueron tipadas como t843, que es el *spa*-tipo asociado a *mecC* más común tanto en fauna silvestre como en ganado, aunque también ha sido detectado en cepas clínicas (García-Álvarez *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2016; Mališová *et al.*, 2020). La cepa *mecC* positiva restante fue tipada como t1535-ST1945/CC130, una línea genética encontrada previamente en ratones de campo y ciervos en España (Gómez *et al.*, 2015, 2014), y también en humanos en varios países europeos (Kerschner *et al.*, 2015; Mališová *et al.*, 2020). Todos los aislados *mecC*-SARM mostraron sensibilidad a los antibióticos no β -lactámicos, una característica muy común en las cepas que portan este determinante de resistencia a metilina, y que ha sido observada por varios autores (García-Álvarez *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2015, 2014; Mališová *et al.*, 2020). La cepa SARM-*mecA* CC398 fue aislada de un buitre negro muestreado en el centro de España. Esta línea genética de SARM-AG ya ha sido detectada en aves de vida libre (Gómez *et al.*, 2016; Porrero *et al.*, 2013), y en otras especies de fauna silvestre (Mama *et al.*, 2019b; Ruiz-Ripa *et al.*, 2019). La presencia del linaje CC398 SARM-AG en buitres negros podría estar relacionada con el contacto directo con animales de producción, o con la adquisición a través de la cadena alimentaria.

En relación con la cepa SASM t267-CC97, se ha descrito en numerosas ocasiones cepas de este linaje, tanto SARM como SASM, causando mastitis bovina (El-Ashker *et al.*, 2020; Käppeli *et al.*, 2019). No se detectaron otras líneas genéticas de SASM que se encuentran frecuentemente en fauna silvestre, como los complejos clonales CC133 o CC1 (Mama *et al.*, 2019b; Porrero *et al.*, 2014).

La especie *S. delphini* coloniza una gran cantidad de especies animales (Gharsa *et al.*, 2015; Nowakiewicz *et al.*, 2016), y también ha sido detectada causando diferentes patologías en animales y humanos (Gary *et al.*, 2014; Magleby *et al.*, 2019). Se encontró *S. delphini* en el 5% de las muestras traqueales de las aves estudiadas, una tasa mucho más baja que la detectada en palomas y equinos (20-37%) (Gharsa *et al.*, 2015; Kizerwetter-Świda *et al.*, 2015; Mama *et al.*, 2019a). *S. delphini* del grupo B fue el clúster predominante entre los aislados de aves silvestres, lo que ya ha sido descrito en palomas (Kizerwetter-Świda *et al.*, 2015), mientras que la familia Mustelidae es el hospedador natural de *S. delphini* del grupo A (Guardabassi *et al.*, 2012).

Es destacable el perfil de resistencia a antibióticos entre las cepas *S. delphini*, ya que todas mostraron resistencia al menos a uno de los antibióticos analizados. Las tasas más altas de resistencia que se encontraron fueron a tetraciclina y penicilina (>50%), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en muestras de visón en Dinamarca (Nikolaisen *et al.*, 2017), mientras que en otros trabajos se destaca una alta sensibilidad a antibióticos en aislados de diferentes especies animales, incluyendo animales de producción (Mama *et al.*, 2019a; Nowakiewicz *et al.*, 2016). En los aislados *S. delphini* se detectó resistencia a lincosamidas y fenicoles, mediada por los genes *lnu(A)* y *fexA*, respectivamente. Estos genes han sido detectados en varias especies de estafilococos de diferentes orígenes (Kehrenberg y Schwarz, 2006; Lozano *et al.*, 2012b), pero no hasta la fecha en *S. delphini*.

Respecto a SCoN, la tasa de colonización traqueal en las aves silvestres (60%) fue mayor que la detectada en jabalíes en España (38%) (Mama *et al.*, 2019c), pero similar a la identificada en aves rapaces en Portugal (75%) (Sousa *et al.*, 2016). Esto sugiere que las aves, o al menos las aves que se alimentan de animales vertebrados e invertebrados, están colonizadas más frecuentemente por SCoN que los mamíferos. Sin embargo, se necesitan más estudios en otras especies animales para corroborar estos datos.

Se detectó una gran diversidad de especies de SCoN en las aves de vida libre, siendo *S. sciuri* la predominante, con alrededor del 70% de las cepas aisladas. Este hecho no fue sorprendente ya que *S. sciuri* tiene un amplio rango de hospedadores y está adaptada a hábitats muy diferentes (Becker *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2017; Nemeghaire *et al.*, 2014). Además, aunque esta especie ha sido encontrada causando infecciones en animales (Chen *et al.*, 2007), *S. sciuri* es la especie de SCoN que se detecta con más frecuencia colonizando fauna silvestre, incluyendo aves, y algunos animales de producción como caballos (Mama *et al.*, 2019c, 2019a; Sousa *et al.*, 2016). *S. lentus* fue la segunda especie más abundante, y fue especialmente predominante entre las muestras de milanos. En estudios previos, *S. lentus* ha sido identificada frecuentemente en muestras procedentes de ganado y de personas con exposición laboral con ganado (de Martino *et al.*, 2010; Mama *et al.*, 2019a; Ugwu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009). Las aves carroñeras estrictas y facultativas estaban colonizadas con más frecuencia por *S. sciuri* y *S. lentus*, lo que sugiere que, además de ser colonizadores del tracto respiratorio, la alimentación a base de carroña puede incrementar la exposición a estas especies de SCoN. Curiosamente, la tasa de colonización por *S. lentus* en los milanos fue mayor en las muestras obtenidas en febrero, cuando se estudiaron los milanos que habían invernado probablemente en el muladar antes de migrar al norte, que en las muestras obtenidas en noviembre, donde se analizaron los milanos que llegaban de las zonas del norte y centro de Europa hasta el muladar. Esta diferencia en la tasa de

colonización, así como como la tasa de resistencia a tetraciclina observada en esta especie (60%), ofrecen evidencias de que las cepas *S. lentus* pudieron haber sido adquiridas del ganado (restos de cerdos y de gallinas ponedoras y pollos de engorde), que se utiliza como alimento en el muladar donde estas aves fueron capturadas. Las especies *S. xylosus* y *S. kloosii*, que están asociadas principalmente a animales, también fueron aisladas de aves rapaces en Portugal (Sousa *et al.*, 2016). Otras especies de SCoN que se detectan frecuentemente como agentes causantes de diferentes enfermedades en humanos, como *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. capitis*, (Becker *et al.*, 2014), también fueron detectadas en las muestras de aves de vida libre.

Al igual que en las cepas *S. aureus*, los porcentajes de resistencia observados en las cepas SCoN para algunos antibióticos son preocupantes, lo que contrasta con las altas tasas de sensibilidad encontradas entre las cepas de jabalíes en España (Mama *et al.*, 2019c). El 24% de las cepas SCoN fueron resistentes a metilina, porcentaje mucho más alto que el observado en mamíferos y aves rapaces (<2,5%) (Mama *et al.*, 2019c; Sousa *et al.*, 2016). La resistencia a metilina estaba mediada en todos los casos por el gen *mecA*, lo que era previsible ya que las descripciones de SCoNRM portadores del gen *mecC* son todavía escasas (Loncaric *et al.*, 2019a) y el gen *mecB* no ha sido descrito, hasta la fecha, en SCoN. Sin embargo, el SCC*mec* tipo XI que portaban las cepas *S. aureus* aisladas de estas muestras podría haber sido transferido a los aislados SCoN. Además, cinco cepas de las especies *S. sciuri* o *S. fleurettii* portaban el gen *mecA* pero eran fenotípicamente sensibles a cefoxitina, lo que ha sido descrito con anterioridad en aislados SCoN de diferentes orígenes (Kulangara *et al.*, 2017). En *S. sciuri* y *S. fleurettii*, al igual que en otras especies del grupo *S. sciuri*, se han descrito genes homólogos del *mecA* que no siempre conllevan la resistencia a metilina (Tsubakishita *et al.*, 2010). Sin embargo, los cebadores que usamos en esta tesis para detectar el gen *mecA*, no amplifican estos genes homólogos, por lo que el fenotipo de sensibilidad a metilina podría ser atribuido a la expresión heterogénea del gen *mecA*. En 26 de las cepas de SCoN no se pudo identificar el mecanismo implicado en la resistencia a penicilina, lo que sugiere la presencia de otros mecanismos de resistencia desconocidos, o que los puntos de corte utilizados para este antibiótico no son precisos para SCoN.

La elevada tasa de resistencia a clindamicina observada en las cepas SCoN (90%) es preocupante, ya que este antibiótico es usado ampliamente en la medicina humana y animal. La resistencia a clindamicina en las cepas *S. sciuri* estaba mediada principalmente por el gen *sal(A)*, que confiere en esta especie resistencia intrínseca a lincosamidas y estreptograminas del grupo A (Hot *et al.*, 2014). Aunque el gen *sal(A)* ha sido descrito con anterioridad en otras especies de SCoN diferentes de *S. sciuri* en animales de compañía en China (Deng *et al.*, 2017), en este trabajo solo fue detectado en *S. sciuri*. La resistencia a macrólidos y lincosamidas mediada por el gen *erm(43)* se detectó en siete cepas de la especie *S. lentus*; este gen codifica una metilasa, cuya presencia es muy inusual, ya que solo ha sido identificado previamente en cepas pertenecientes al grupo *S. sciuri* (Mama *et al.*, 2019c; Schwendener y Perreten, 2012). Este gen ha sido detectado integrado en el ADN cromosómico de cepas de *S. lentus* de origen humano y animal que presentaban resistencia inducible a clindamicina (Schwendener y Perreten, 2012). Sin embargo, todas las cepas aisladas de aves silvestres portadoras del gen *erm(43)*, excepto una, presentaron resistencia constitutiva a clindamicina. Se identificaron numerosos aislados de diferentes especies animales con el fenotipo macrólidos-sensible/lincosamidas-

resistente, mediado principalmente por el gen *lnu(A)*; dicho gen se localiza generalmente en plásmidos de pequeño tamaño, que podría ser un factor clave para facilitar su diseminación por transferencia génica horizontal entre las cepas de diferentes especies de SCoN (Schwarz *et al.*, 2018).

Es necesario resaltar la alta tasa de resistencia a tetraciclina observada entre las cepas *S. lentus* (60%), con respecto a la tasa de resistencia total de SCoN (17%), la cual estaba mediada principalmente por la presencia del gen *tet(K)*. Tasas de resistencia a tetraciclina por encima del 50% en *S. lentus* se han detectado previamente en cepas procedentes de ganado (Ugwu *et al.*, 2015; Vanderhaeghen *et al.*, 2013), lo que puede ser atribuido al amplio uso de este antibiótico en veterinaria. La detección del gen *dfvK*, junto al gen *tet(L)*, en una cepa *S. lentus* sugiere su localización en un plásmido del tipo pKKS2187, que han sido descritos con anterioridad en SARM-CC398 y en SCoNRM de origen porcino (Kadlec y Schwarz, 2009; Ugwu *et al.*, 2015). Esto respalda la hipótesis de que los milanos pudieron adquirir SCoN de los restos de ganado en el muladar por contacto directo o a través de la cadena alimentaria. En los polluelos de buitre negro, la potencial ruta de colonización es menos obvia. Los buitres suelen alimentarse de carroña nativa y, en el caso de esta colonia que se encontraba situada en un Parque Nacional cerca de Madrid, no hay muladares en su área de búsqueda de alimento. Sin embargo, la búsqueda de alimento en vertederos urbanos podría ser una ruta de colonización por SCoN, debida a la exposición de los adultos en el vertedero y la subsecuente colonización de los polluelos en el nido o por medio de la cadena alimentaria, como se ha demostrado en cigüeñas (Gómez *et al.*, 2016).

Es destacable la tasa de resistencia a ácido fusídico (> 80%) en las cepas SCoN de aves silvestres, que son comparables a las observadas en aislados de ganado y del ambiente ganadero (Nemeghaire *et al.*, 2014; Schoenfelder *et al.*, 2017; Ugwu *et al.*, 2015). Para la mayoría de las cepas resistentes no se pudo detectar el mecanismo de resistencia implicado, lo que sugiere la presencia de mutaciones en el gen *fusA* o mecanismos de resistencia intrínsecos como los genes *fusD* en *S. saprophyticus* o *fusE* en *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (O'Neill *et al.*, 2007). Por otro lado, el gen *fusD*, intrínseco en *S. saprophyticus*, podría no siempre ser funcional, ya que una de nuestras cepas portadoras de dicho gen fue sensible a ácido fusídico.

Afortunadamente, todas las cepas SCoN aisladas de aves fueron sensibles a linezolid y, hasta la fecha, no se ha detectado ninguna cepa aislada de fauna silvestre resistente a este antibiótico.

Como ha sido previamente descrito por otros autores (Nemeghaire *et al.*, 2014; Saber *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2009), el SCCmec tipo IV y, especialmente, el SCCmec tipo III, son los más frecuentes en cepas SCoNRM de origen animal. Sin embargo, la mayoría de las cepas SCoNRM portadoras del gen *mecA* no pudieron ser tipadas, lo que destaca la gran diversidad de tipos SCCmec en SCoN y sugiere la presencia de nuevos tipos, diferentes a los descritos en SARM.

1.2. *Staphylococcus* spp. de muestras ambientales de granjas porcinas

Diferentes estudios han demostrado que las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de ganado y del ambiente ganadero albergan numerosos genes de resistencia y, en algunas ocasiones, también de virulencia (Bertelloni *et al.*, 2015; Cuny *et al.*, 2017; Feßler *et al.*, 2018a; Klibi *et al.*, 2018; Schoenfelder *et al.*, 2017; Ünal y Çinar, 2012; Wang *et al.*, 2015a; Wendlandt *et al.*, 2013). Cada vez hay más evidencias de que la ganadería está contribuyendo a la diseminación de bacterias resistentes a

antibióticos en el medio ambiente. Además, es necesario evaluar el papel del aire como posible ruta de transmisión de SARM CC398 de animales a humanos. Por esto, se caracterizó y comparó los perfiles de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus* spp. aislados del medio ambiente de dos granjas porcinas con diferente sistema de producción.

En un estudio previo realizado en EE.UU., *S. aureus* fue la especie predominante en el aire de una granja porcina con producción intensiva (Gibbs *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestras muestras, la especie *S. aureus* fue detectada únicamente en la granja con producción intensiva y solamente representó el 14% de los estafilococos aislados. La detección de SARM-CC398 era previsible ya que es la línea genética de SARM-AG más prevalente en Europa (Price *et al.*, 2012). Estas cepas presentaron un perfil SARM-AG típico, con un fenotipo y genotipo de multiresistencia. Dado que los aislados carecían del sistema IEC y presentaron resistencia a tetraciclina, es probable que estas cepas correspondan al clado animal (Price *et al.*, 2012). La detección de *S. aureus* del mismo linaje genético pero que difieren en su perfil de resistencia a antibióticos (SARM/SASM-CC398) sugiere diferentes estadios evolutivos de este clado, debido a la adquisición del SCCmec y de elementos genéticos móviles portadores de diferentes genes de resistencia a antibióticos. Algunos de los genes de resistencia detectados en las cepas *S. aureus*, como *erm(C)* y *vga(A)*, se localizan en plásmidos de pequeño tamaño, identificados con frecuencia en cepas SARM CC398 (Feßler *et al.*, 2018a).

Se detectó una gran diversidad de especies de SCoN en la granja PI. Sin embargo, en la granja PSE, además de detectarse un menor número de especies, destacó la abundante presencia de la especie *S. arlettae*, que contaba con casi el 50% del total de las cepas aisladas de esta granja. Esta especie es considerada como comensal en animales (Becker *et al.*, 2014), aunque ha sido descrita en algunas ocasiones provocando diferentes tipos de infecciones en ganado, especialmente mastitis, pero también en humanos (Bernier Gosselin *et al.*, 2019; Mittal *et al.*, 2019). De hecho, se ha identificado un incremento en los aislamientos de *S. arlettae* en muestras clínicas en los últimos años y, por lo tanto, está considerada como un patógeno emergente (Mittal *et al.*, 2019). Esta especie parece estar adaptada a diferentes hábitats y tiene gran capacidad para sobrevivir en diferentes compartimentos ambientales como suelos contaminados, agua marina, e incluso ha sido detectada en la superficie de teléfonos móviles (Kurli *et al.*, 2018). Entre las cepas de las dos granjas porcinas, se detectó una combinación de especies que tradicionalmente han sido asociadas con aislamientos de humanos como *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* y *S. simulans*, y otros que están estrechamente relacionados con animales o el medio ambiente, como *S. arlettae*, *S. cohnii*, *S. sciuri* o *S. lentus*. Llama la atención la poca frecuencia de la especie *S. sciuri*, porque en un estudio similar en Alemania se detectó una prevalencia del 45% de esta especie (Schoenfelder *et al.*, 2017). Además, fue sorprendente que no se identificara *S. hyicus* en el aire o en el tanque de purines de estas granjas, ya que está considerado el mayor patógeno del género *Staphylococcus* en cerdos (Foster, 2012).

Los resultados obtenidos con el análisis estadístico de las tasas de resistencia a antibióticos en las cepas SCoN, indican que el sistema productivo puede ser un factor implicado en los resultados observados. Las tasas de resistencia a metilicina (26% y 0% en la granja PI and PSE, respectivamente), son mucho más bajas que las encontradas en un estudio que caracterizó SCoN del medio ambiente ganadero en Alemania (64%). Esto puede ser debido a la baja presencia de la especie *S. sciuri*, ya que

en el estudio alemán la mayor parte de las cepas resistentes a meticilina pertenecían a esta especie (Schoenfelder *et al.*, 2017). La resistencia a meticilina estaba mediada en todos los casos por el gen *mecA*, y como se observó en las cepas aisladas de las muestras traqueales de aves silvestres, dos cepas *S. sciuri* portaban el gen *mecA* pero fueron fenotípicamente sensibles a meticilina.

Entre los numerosos genes de resistencia detectados que mediaban la resistencia a macrólidos y lincosamidas, tiene especial relevancia la presencia de una cepa *S. haemolyticus* portadora del gen *erm(T)*. Este gen está estrechamente relacionado con *S. aureus*-CC398 del clado humano (Feßler *et al.*, 2018a), pero también existen descripciones de este gen en SCoN de origen animal (Klibi *et al.*, 2018). Normalmente se localiza en plásmidos de gran tamaño que con frecuencia portan otros genes de resistencia a antibióticos (Schwarz *et al.*, 2018). Al igual que en las muestras traqueales de aves, el gen *sal(A)* estuvo presente en todas las cepas *S. sciuri* y se detectó exclusivamente en esta especie.

Las altas tasas de resistencia a tetraciclina observadas, especialmente en las cepas SCoN aisladas de la granja PI (90% y 40% en la granja PI y PSE, respectivamente), quizás sean debidas al uso de este grupo de antibióticos en producción animal. En un estudio previo en el ambiente de granjas porcinas, la tasa de resistencia a tetraciclina observada se encontró en un punto medio de nuestros resultados (71%) (Schoenfelder *et al.*, 2017). Como se ha descrito anteriormente, el gen *tet(K)* es el más prevalente en estafilococos resistentes a tetraciclina de origen animal (Wendlandt *et al.*, 2013).

Las cepas SCoN presentaron altas tasas de resistencia a ácido fusídico, pero los mecanismos de resistencia, *fusB* y *fusD*, solo se pudieron identificar en una cepa *S. epidermidis* y en otra *S. saprophyticus*. Al igual que ocurría en SCoN de aves silvestres, esto lo asociamos a la presencia de mecanismos de resistencia desconocidos o no detectados en las cepas restantes.

Es de interés la presencia del gen *dfrA* (en combinación con *dfrK*) en una cepa *S. epidermidis*; este gen de resistencia, que está asociado al transposón Tn4003, está relacionado principalmente con cepas aisladas de humanos (Wendlandt *et al.*, 2013), aunque también ha sido detectada en SCoN de animales de compañía (Loncaric *et al.*, 2019c).

1.3. *S. aureus* de animales de producción con signos de infección

Las infecciones estafilocócicas en ganado porcino están causadas principalmente por la especie *S. hyicus*, aunque otras especies como *S. aureus* también han sido descritas en algunas ocasiones, especialmente asociadas con infecciones de piel (Foster, 2012). Además, también se ha descrito un gran brote de epidermitis exudativa en cerdos en una granja de Países Bajos provocada por SARM t011-CC398-SSC*mecIV* (Van Duijkeren *et al.*, 2007). Como ya se ha comentado, las cepas de SARM-AG tienen una especial importancia por la cantidad de genes de resistencia que portan y por la posibilidad de transferencia a humanos.

Entre las cepas *S. aureus* aisladas de cerdos con signos de infección, la línea genética más prevalente fue SARM-AG del complejo clonal CC398. Esto era previsible ya que es el linaje genético más frecuente en animales de producción en España (Gómez-Sanz *et al.*, 2010) y también ha sido identificado en infecciones de cerdos en Portugal (Santos *et al.*, 2020). La prevalencia de SARM CC398 en animales de producción es difícil de determinar, sin embargo, se ha estimado que en los Países Bajos el 40-80% de las granjas de cerdos son positivas para SARM CC398 (Broens *et al.*, 2011). Entre

las cepas aisladas no se detectaron otros linajes genéticos de SARM-AG que colonizan frecuentemente ganado en Europa, como el CC1 y CC97 (Butaye *et al.*, 2016; Gómez-Sanz *et al.*, 2010).

En nuestras cepas, la mayoría de los aislados SARM CC398 se tiparon como t011 (n=13), que es el *spa*-tipo más frecuente en cerdos en Europa, mientras que el t034, detectado en dos aislados, es el más prevalente en países asiáticos (Butaye *et al.*, 2016; Chanchaithong *et al.*, 2019; Peeters *et al.*, 2015). Además, el *spa*-tipo t011 es el predominante en cepas SARM-CC398 en hospitales españoles en áreas con una alta densidad de ganado porcino (Ceballos *et al.*, 2019). Esto indica la capacidad de esta línea genética y, especialmente del *spa*-t011, para adaptarse a diferentes ecosistemas, y la importancia de los cerdos portadores de SARM-CC398 como diseminadores de esta línea genética. SARM-CC398 de los *spa*-tipos t1456 y t1451 han sido descritos en numerosas ocasiones en aislados precedentes de animales y humanos, incluyendo colonización e infección, en países europeos como Alemania y Portugal (Feßler *et al.*, 2012; Köck *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2020). En España, SARM-CC398 del *spa* t1451 ha sido descrito en una infección especialmente severa en un trabajador de una granja avícola; esta cepa tenía características del clado animal y un marcador de adaptación a humanos (resistencia a tetraciclina pero portador del sistema IEC), lo que podría indicar un nuevo paso evolutivo en la adaptación de esta línea genética a humanos (Pérez-Moreno *et al.*, 2017).

Como han descrito otros autores (Butaye *et al.*, 2016; Ceballos *et al.*, 2020), la resistencia a tetraciclina es un marcador de la detección de SARM-AG CC398, lo que también ha sido observado entre las cepas estudiadas. La resistencia a tetraciclina mediada por el gen *tet(M)* es característica de SARM CC398 y no es frecuente en SARM de origen humano (Butaye *et al.*, 2016; Ceballos *et al.*, 2020; Peeters *et al.*, 2015). El gen *tet(M)*, que codifica una proteína de protección ribosomal, media la resistencia a todos los antibióticos del grupo de las tetraciclinas y normalmente se encuentra localizado en transposones del tipo Tn916 en las cepas SARM-CC398 de origen animal. Además, la combinación de los genes *tet(M)* y *tet(K)* se detectó en 18 de las 20 cepas SARM-CC398. En algunas cepas SARM, el gen de resistencia a tetraciclina *tet(K)* se encuentra integrado entre las regiones *ccr* y *J* del *SCCmec V*, que es el que fue detectado en las cepas estudiadas (Butaye *et al.*, 2016; Larsen *et al.*, 2016a). Dado que las cepas SARM-CC398 ya portan el gen *tet(M)*, parece que la adquisición del gen *tet(K)* no supondría una ventaja adaptativa para este linaje. Sin embargo, se ha observado que las cepas SARM-CC398 que portan el gen *tet(M)* y adquieren el *tet(K)*, ven mejorado significativamente su *fitness* a concentraciones subletales de tetraciclina, lo que ha podido contribuir al éxito de SARM-CC398 en el ambiente ganadero (Larsen *et al.*, 2016a).

Se detectó una cepa SARM del complejo clonal CC9 aislada de líquido sinovial. Aunque SARM ST9/CC9 se describió por primera vez en ganado porcino en Italia en el año 2008 (Battisti *et al.*, 2010), es un linaje poco frecuente en ganado en Europa. De hecho, hasta la fecha, esta es la primera detección de SARM del CC9 en cerdos en España. Sin embargo, este linaje genético si ha sido detectado en muestras clínicas de un hospital localizado en un área con alta densidad de ganado porcino (Reynaga *et al.*, 2017). La cepa SARM CC9 detectada en nuestro estudio no presentó un fenotipo de multiresistencia, ni resistencia a tetraciclina, a diferencia de los hallazgos previos en aislados procedentes de Asia o de Europa (Lo *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2016). En SARM-CC9 en países asiáticos, los tipos *SCCmec* tienen una cierta distribución geográfica (Butaye *et al.*, 2016), pero los *SCCmec* tipo

IV y V son los detectados con mayor frecuencia (Butaye *et al.*, 2016; Lo *et al.*, 2012; Peeters *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2016). Sin embargo, también hay muchas descripciones de elementos SCC*mec* no tipables (Butaye *et al.*, 2016; Lo *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2016), como el detectado en la cepa de este estudio, lo que puede deberse a la presencia de complejos *mec* y *ccr* nuevos.

Las dos cepas SASM CC9 detectadas se tiparon como t899, el cual ha sido también descrito como un *spa*-tipo asociado al CC398 (Price *et al.*, 2012). La variante sensible a meticilina de *S. aureus* CC9 ha sido detectada en ganado y también en personas con contacto con ganado en diferentes países europeos, incluyendo España (Benito *et al.*, 2015; Kehrenberg *et al.*, 2009; Vandendriessche *et al.*, 2014), lo que sugiere diferentes estadios evolutivos de este linaje, debido a la adquisición del SCC*mec*.

Todas las cepas *S. aureus* aisladas de cerdos con signos de infección, excepto una, exhibieron un fenotipo de multiresistencia y portaban numerosos genes que confieren resistencia a antibióticos importantes en medicina humana y animal, lo que pone de manifiesto la alta presión selectiva de antibióticos a los que son sometidos estos animales. Tres cepas portaban el gen *erm*(T), frecuentemente detectado en SASM-CC398 del clado humano, pero infrecuente en SARM-CC398 (Schwarz *et al.*, 2018). Cinco cepas *S. aureus* del linaje CC398 o CC9 presentaron el fenotipo inusual macrólidos-sensible/lincosamidas-resistente, con los genes *lnu*(A), *lnu*(B) y *vga*(A), lo que está siendo detectado con frecuencia en SARM-AG en los últimos años (Ceballos *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020). La resistencia a fenicoles estuvo mediada en todos los casos por el gen *fexA*. La ausencia de genes *cat* en nuestras cepas, está en concordancia con estudios previos en SARM-AG (Butaye *et al.*, 2016); este hecho puede ser debido a que los genes *cat* no confieren resistencia a fenicoles fluorados, como el florfenicol, muy utilizado en ganadería porcina. Llama especialmente la atención que no se detectara ninguna cepa con resistencia a trimetoprim, mediada por *dfpK*, ya que este gen se ha descrito en numerosos plásmidos de gran tamaño y en el transposón Tn559 en cepas SARM-AG CC398 (Feßler *et al.*, 2018a).

1.4. SCoP de animales de compañía con signos de infección

La epidemiología de *S. aureus* y *S. pseudintermedius* en animales de compañía ha adquirido especial interés en los últimos años, no solo por su importancia en medicina veterinaria, sino también por su implicación en salud pública, debido a la exposición y transmisión interespecies de *S. aureus* y *S. pseudintermedius* entre los animales y sus dueños (Gómez-Sanz *et al.*, 2013d, 2013c), así como la potencial transferencia de genes de resistencia a cepas de estafilococos adaptadas a humanos.

Veintiocho de las cepas SCoP aisladas de animales de compañía se identificaron como *S. pseudintermedius*, lo que era esperable ya que es la especie de estafilococo más común detectada como colonizador y como causante de infección en animales de compañía, especialmente en perros (Pires Dos Santos *et al.*, 2016; van Duijkeren *et al.*, 2011). *S. pseudintermedius* y *S. aureus* fueron detectadas en tres y dos gatos, respectivamente. Estas especies de estafilococos han sido aisladas previamente de gatos enfermos (Bierowiec *et al.*, 2019; Kaspar *et al.*, 2018), sin embargo, un estudio reciente ha descrito la predominancia de otras especies de estafilococos, como *S. felis* y *S. haemolyticus*, en infecciones felinas (Bierowiec *et al.*, 2019).

En perros, casi el 90% de las patologías dermatológicas están causadas por *S. pseudintermedius* (González-Domínguez *et al.*, 2020). La mayoría de las cepas estudiadas fueron aisladas de infecciones urinarias o del aparato reproductor (68%), mientras que las infecciones del tegumento suponían un 18%.

Cinco de las ocho cepas SPRM detectadas se adscribieron a la secuencia tipo ST71, y mostraron el mismo patrón de PFGE. Estas cepas fueron aisladas de cinco perros distintos en años diferentes y, aparentemente, sin relación entre ellos; sin embargo, los cinco perros pasaron por el quirófano en el hospital veterinario y, aunque fueron asistidos por veterinarios diferentes y el quirófano y el material quirúrgico son desinfectados continuamente, no se puede descartar la diseminación a este nivel. Ya han sido descritos brotes causados por SPRM-ST71 en hospitales veterinarios (Grönthal *et al.*, 2014), lo que pone de manifiesto su gran capacidad de supervivencia en el ambiente por largos periodos de tiempo. SPRM-ST71 es el principal clon de *S. pseudintermedius* en Europa (Grönthal *et al.*, 2017; Somayaji *et al.*, 2016a) y ya existen algunas descripciones de este linaje en perros sanos en España (Gómez-Sanz *et al.*, 2013d, 2011). Sin embargo, estudios recientes muestran una tendencia descendente en la prevalencia SPRM-ST71 en animales de compañía en el norte de Europa y Francia (Bergot *et al.*, 2018; Duim *et al.*, 2016; Grönthal *et al.*, 2017). El linaje SPRM-ST258, que fue detectado en este estudio en el año 2009, parece estar reemplazando a SPRM-ST71 en estos países (Duim *et al.*, 2016; Grönthal *et al.*, 2017). Las dos cepas SPRM restantes pertenecían a la secuencia tipo ST68, una línea genética que es mayoritaria en EE.UU., aunque ha sido detectada fuera de este país (Pires Dos Santos *et al.*, 2016). Sin embargo, esta es la primera descripción de SPRM-ST68 en animales de compañía en España.

Estudios anteriores han referido cepas SARM de las líneas genéticas SARM-AH y SARM-AC en animales de compañía (Couto *et al.*, 2016; Loeffler *et al.*, 2011). Sin embargo, la única cepa SARM identificada en este estudio perteneció al linaje SARM-AG CC398. Este linaje ha sido detectado en algunas ocasiones en perros enfermos (Couto *et al.*, 2016; Wipf y Perreten, 2016; Witte *et al.*, 2007), sin embargo, esta es la primera descripción en España. En relación con las cepas SASM, los complejos clonales CC22 y CC5 están ampliamente distribuidos en animales de compañía (Couto *et al.*, 2016; Gómez-Sanz *et al.*, 2013b; Wipf y Perreten, 2016). La cepa SASM restante fue tipada como t10576-ST1660 y, curiosamente, la única descripción de este linaje genético es en una cepa aislada la misma semana de un caballo hospitalizado en el hospital veterinario, que presentó el mismo fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos y similar contenido en genes de virulencia (Gómez-Sanz *et al.*, 2014).

La frecuencia de resistencia a metilina y de multiresistencia entre las cepas SCoP aisladas de animales de compañía es de gran preocupación para la medicina veterinaria. La tasa de resistencia a metilina observada (27%) es mayor que la encontrada en aislados de animales de compañía enfermos en diferentes países como Finlandia (14%), Países Bajos (5%) y Francia (17%) (Duim *et al.*, 2016; Grönthal *et al.*, 2017; Haenni *et al.*, 2014; Worthing *et al.*, 2018). Como en nuestras cepas, SPRM-ST71 son normalmente multiresistentes (Duim *et al.*, 2016; Somayaji *et al.*, 2016b) y, en comparación con otros STs, se detecta resistencia a fluoroquinolonas con mucha frecuencia (Duim *et al.*, 2016; Worthing *et al.*, 2018). Afortunadamente, y de acuerdo con anteriores trabajos (Couto *et al.*, 2016; Somayaji *et al.*, 2016b), todas las cepas tanto de *S. aureus* como de *S. pseudintermedius* fueron sensibles a antibióticos importantes en la medicina humana, como vancomicina y linezolid.

El gen *dfrrK* se ha detectado en escasas ocasiones en *S. pseudintermedius* (Couto *et al.*, 2016; Ruzauskas *et al.*, 2016). El transposón Tn559, portador del gen *dfrrK*, se detectó por primera vez en una cepa SASM ST398 (Kadlec y Schwarz, 2010), y posteriormente en otras especies de estafilococos de diversos orígenes (Gómez-Sanz *et al.*, 2014), pero también en *E. faecium* (López *et al.*, 2012). Sin embargo, esta es la primera descripción del Tn559 en *S. pseudintermedius*. Esto sugiere un intercambio de genes de resistencia entre estafilococos y otras bacterias Gram-positivas, incluyendo enterococos, de origen animal, pero también de origen humano.

2. Mecanismos de resistencia a linezolid en *Staphylococcus* de diferentes orígenes. Estudios comparativos con *Enterococcus* spp.

Cuando se introdujo el linezolid en el año 2000, se pensó que por su exclusivo mecanismo de acción y por no estar estructuralmente relacionado con otras familias de antibióticos, iba a ser difícil que las bacterias adquirieran resistencia (Fines y Leclercq, 2000). Sin embargo, solo un año después de su introducción se detectó la primera cepa estafilococos LZD^R (Tsiodras *et al.*, 2001), y en el 2003 la primera cepa de enterococos LZD^R (Sánchez-Gómez *et al.*, 2006). La resistencia a linezolid representa un gran riesgo para la salud pública, ya que es considerado como un antibiótico de último recurso en la medicina humana. Por lo tanto, resulta crucial determinar los mecanismos de resistencia a linezolid actuales en todos los ámbitos.

2.1. *Staphylococcus* spp. LZD^R de muestras de aire de granjas porcinas y de procesos infecciosos de animales de producción

El gen *cfr* se detectó en 3 cepas de las especies *S. aureus*, *S. arlettae* y *S. equorum* procedentes de ganado o del ambiente ganadero. Aunque la resistencia a linezolid no es común todavía entre las bacterias Gram-positivas (Mendes *et al.*, 2018), el gen *cfr* se ha detectado frecuentemente en estafilococos aislados de animales de producción y su ambiente en países como Alemania y China (Cuny *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015a). Esto puede deberse a la coselección de resistencias, ya que los fenicoles y las lincosamidas se usan ampliamente en ganadería.

El gen *cfr* se ha descrito en varias especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de diferentes orígenes (Shen *et al.*, 2013), incluyendo *S. arlettae* de muestras clínicas en la India o de origen porcino en China (Mittal *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2012), y en *S. equorum* de muestras cárnicas en China (Zeng *et al.*, 2014). Recientemente, se ha detectado este gen en una cepa *S. arlettae* aislada de una muestra fecal de una granja aviar, en un plásmido de 63 kb que además del gen *cfr*, portaba otros ocho genes de resistencia a diferentes antibióticos de la familia de las tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos, entre otros (GenBank KX274135) (Liu *et al.*, 2017).

En las cepas *S. arlettae* y *S. equorum* LZD^R de esta tesis no se detectó la presencia de mutaciones en el ARNr 23S, ni cambios aminoacídicos en los genes codificantes de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22; esto era de esperar ya que estos cambios están normalmente relacionados con la exposición a linezolid y, por lo tanto, son más comunes en aislados clínicos.

Dada la estrecha asociación entre los genes *cfr* y *fexA*, llama especialmente la atención que las dos cepas de las muestras de aire no tuvieran el gen *fexA*. Sin embargo, se han descrito numerosas cepas de diferentes especies de SCoN portadoras del gen *cfr* que no albergaban el gen *fexA*, o que este no se encontraba en el entorno genético del gen *cfr* (Wang *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2014)

El entorno *cfr* de las cepas *S. arlettae* X114 y *S. equorum* X109 guarda una alta similitud con el del plásmido pSP01 de *S. epidermidis* SP1, el cual contiene además de los genes *cfr* y *Isa(B)*, también *blaZ*, *msr(A)* y *ant(4')-Ia* (Brenciani *et al.*, 2016). Los genes *blaZ* y *ant(4')-Ia* estaban ausentes de nuestras cepas, así que se descartó que las cepas de la granja porcina portasen un plásmido pSP01-tipo. Respecto a la secuencia del plásmido pSP01, en nuestras cepas no se detectó el transposón Tn552, que está compuesto por las transposasas *tnpA*, *tnpB* y *tnpC* y el operón *blaZ* (que consta del gen estructural *blaZ* y los genes que controlan su expresión *blaI* y *blaR1*), y que es capaz de movilizarse a diferentes partes del genoma (Sidhu *et al.*, 2002).

Fue sorprendente que el gen *cfr* no se transfiriera por conjugación a *S. aureus* desde las cepas SCoN LZD^R ya que, en la parte de su entorno genético identificada, se detectaron numerosos genes con función conjugativa, lo que proporciona evidencias sobre su posible localización plasmídica. Además, la transferencia del gen *cfr* entre diferentes especies de estafilococos (de SCoN a *S. aureus*) ha sido efectuada previamente por conjugación (Cafini *et al.*, 2016).

La cepa SARM X2063 del linaje CC398, aislada de la herida de un cerdo, también era portadora del gen *cfr*. Se han descrito esporádicamente cepas SARM del linaje CC398 con el gen *cfr* en diferentes países europeos, principalmente colonizando cerdos, pero también colonizando e infectando humanos (Kehrenberg *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2016b; Paridaens *et al.*, 2017; Peeters *et al.*, 2015). La detección del gen de multiresistencia *cfr* en cepas de esta línea genética es de gran preocupación veterinaria, pero también tiene gran importancia para las personas con contacto directo con ganado, ya que la transmisión de esta línea genética de cerdos a humanos ha sido notificada (Price *et al.*, 2012). De hecho, en esta tesis se ha descrito una cepa clínica SARM-CC398, portadora del gen *cfr*, aislada de un granjero. Estas dos cepas son las primeras descripciones del gen *cfr* en SARM-AG CC398 en España. En esta cepa, se detectó el gen *cfr* en una variante del Tn558, junto con el gen *fexA*. Esta variante fue descrita por primera vez en el plásmido pSCFS7 de una cepa SARM USA300 LPV-positiva de Irlanda (Shore *et al.*, 2010), pero también ha sido detectada en cepas SARM-CC398 (Kehrenberg *et al.*, 2009). El gen *cfr* de nuestra cepa no pudo transferirse, aunque la transferencia por conjugación de plásmidos tipo pSCFS7 ha sido descrita en varias ocasiones (Cafini *et al.*, 2016).

En la cepa *S. aureus* X2063, como era de esperar, no se detectaron mutaciones en el dominio V del ARNr 23S ni cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales L3 y L22, pero, esta cepa presentó el cambio aminoacídico V109A en el gen codificante de la proteína ribosomal L4. Sin embargo, no se ha encontrado información acerca de la relación de este cambio aminoacídico con la sensibilidad a linezolid, ni a otros antibióticos.

2.2. *Staphylococcus* spp. LZD^R de origen clínico

Diferentes estudios han descrito la emergencia de la resistencia a linezolid en *Staphylococcus* spp. en todo el mundo (Bender *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2010; Musumeci *et al.*, 2016).

Además, en España se han descrito dos brotes hospitalarios causados por *S. aureus* LZD^R portadores del gen *cfr* (García *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2010). Aunque se pone especial atención en las cepas de *S. aureus*, se ha observado que la tasa de resistencia a linezolid es mayor entre cepas de SCoN (0,05% en *S. aureus* y 1,4% en SCoN), especialmente en *S. epidermidis* (Gu *et al.*, 2013).

Entre las cepas *Staphylococcus* spp. LZD^R de origen clínico, solo se detectó el gen de resistencia *cfr*. En estudios anteriores se ha descrito la presencia del gen *poxA* en estafilococos de muestras clínicas (Antonelli *et al.*, 2018; D'Andrea *et al.*, 2019), mientras que, hasta la fecha, el gen *optrA* no ha sido identificado en cepas de humanos de este género bacteriano. El gen *cfr* ha sido detectado en cepas de estafilococos de origen clínico en diferentes países (Baos *et al.*, 2013; Bender *et al.*, 2015; Mendes *et al.*, 2018, 2010; Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020), y, en muchas ocasiones, asociado con otros mecanismos de resistencia a linezolid (Baos *et al.*, 2013; Bender *et al.*, 2015).

Como han observado varios autores (Baos *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2018; Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020), las mutaciones en diferentes sitios diana de las oxazolidinonas son comunes en los estafilococos LZD^R de origen clínico. Se ha demostrado que el principal mecanismo de resistencia a linezolid es atribuible a mutaciones en el ARNr 23S y, como en las cepas estudiadas, el cambio G2576T es el más frecuente en todo el mundo (Baos *et al.*, 2013; Bender *et al.*, 2015; de Almeida *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2018; Musumeci *et al.*, 2016; Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020). La mutación puntual C2534T, detectada en una cepa *S. epidermidis*, es también una de las más comunes en aislados clínicos de esta especie (Tewhey *et al.*, 2014). Muchas de las mutaciones que conllevan cambios aminoacídicos, detectadas en la proteína ribosomal L3 (p.ej.: V154L, A157R, M156T, L101V), han sido previamente identificadas en *S. epidermidis* LZD^R de origen clínico (Baos *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2018; Musumeci *et al.*, 2016; Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020; Tewhey *et al.*, 2014). Sin embargo, no existen datos acerca de otros cambios aminoacídicos, como G137V, y su relación con la sensibilidad a linezolid. Como se ha observado en varios estudios, el gen codificante de la proteína ribosomal L4 presenta con frecuencia inserciones y deleciones (Mendes *et al.*, 2018; Musumeci *et al.*, 2016; Tewhey *et al.*, 2014), y la inserción de una glicina en la posición 71, que fue detectada en siete cepas *S. epidermidis*, ha sido previamente descrita (Mendes *et al.*, 2018; Musumeci *et al.*, 2016). Por el contrario, los cambios aminoacídicos en la proteína ribosomal L22 son poco frecuentes entre las cepas de estafilococos LZD^R (Baos *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2018; Musumeci *et al.*, 2016; Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020). La relación de algunos de los cambios aminoacídicos detectados en las proteínas ribosomales L3 y L4 con la sensibilidad a linezolid es cuestionable, ya que otros trabajos han referido cambios aminoacídicos en la L4 (p.ej.: L101V), que no están involucrados en la resistencia a linezolid (de Almeida *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2010). No existen datos acerca de la relación del cambio aminoacídico V118A en la proteína L4, detectado en dos de nuestras cepas clínicas SARM, con la sensibilidad a linezolid, pero sí parece estar asociado con la sensibilidad reducida a la pleuromutilina lefamulina (Mendes *et al.*, 2019)

Entre los SCoN, *S. epidermidis* es la especie con más relevancia a nivel clínico y está relacionada principalmente con infecciones asociadas a dispositivos médicos (Becker *et al.*, 2014). La resistencia a linezolid ha sido previamente detectada en aislados clínicos *S. epidermidis* de diferentes secuencias tipo (p.ej.: ST22, ST5, ST23, ST24, ST185, ST186) (Lozano *et al.*, 2012d; Tewhey *et al.*, 2014), pero, sin duda, la más frecuente es ST2. *S. epidermidis* del linaje ST2/CC5 se encuentra asociado a infecciones

hospitalarias e involucrado con la resistencia a linezolid en todo el mundo (Becker *et al.*, 2014; de Almeida *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2018, 2010). *S. epidermidis* LZD^R de la secuencia tipo ST2 ha sido descrito previamente en numerosas regiones españolas (Lozano *et al.*, 2013; Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020; Seral *et al.*, 2011), incluyendo hospitales de la misma región que los que participaron en nuestro estudio. Además, un clon de *S. epidermidis* ST2, resistente a meticilina y a linezolid con mutaciones en diferentes sitios diana de las oxazolidinonas, está establecido en la Unidad de Cuidados Intensivos de un hospital terciario español (Rodríguez-Lucas *et al.*, 2020), por lo que este clon debe ser vigilado. Algunos autores atribuyen la diseminación de este linaje en el ámbito clínico a su capacidad de producir biofilm y a la presencia de numerosos genes de resistencia (Becker *et al.*, 2014).

La resistencia a linezolid en la especie *S. hominis* ha sido descrita en varias ocasiones en diferentes países, incluyendo España, pero exclusivamente entre cepas de origen clínico. Al igual que la cepa de nuestro estudio, normalmente la resistencia a linezolid estaba mediada por la mutación G2576T en el ARNr 23S, pero también se han descrito aislados con mutaciones en la proteína ribosomal L3 y portadores del gen *cfz* (Chamon *et al.*, 2014; De Almeida *et al.*, 2013; López-Fabal *et al.*, 2013).

La cepa SARM X1761 portadora del gen *cfz*, fue tipada como t011-ST398/CC398-SCC*mecV-agrI*. Como ya se ha comentado anteriormente, esta cepa y la aislada de un cerdo con signos de infección fueron las dos primeras descripciones de SARM CC398 con el gen *cfz* en España. Un estudio reciente en hospitales españoles demostró la correlación entre la densidad de ganado porcino de la región y la presencia de SARM CC398 en infecciones a nivel hospitalario (Ceballos *et al.*, 2019). El Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida donde se aisló esta cepa, está localizado en la región española con la densidad de ganado porcino más alta en el año 2019 (370 cerdos/km²). Además, el paciente era un trabajador de una granja porcina, lo que está considerado como un factor de riesgo para la colonización humana por SARM-CC398 (Price *et al.*, 2012).

En todos los casos, la resistencia a linezolid estaba asociada en nuestro estudio con un fenotipo y genotipo de multiresistencia, y con resistencia a meticilina en todas las cepas excepto una, lo que ha sido previamente descrito (Baos *et al.*, 2013; Musumeci *et al.*, 2016). Sin embargo, el linezolid sigue siendo efectivo en más del 99% de los patógenos SARM y SCoNRM en todo el mundo (Shariati *et al.*, 2020). Como observaron otros autores, la resistencia a vancomicina, teicoplanina y daptomicina no es común entre las cepas SCoN y *S. aureus* LZD^R. Sin embargo, presentan tasas de resistencia a lincosamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas por encima del 90% (Baos *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2013; Musumeci *et al.*, 2016). Todas las cepas *S. epidermidis* mostraron resistencia a cloranfenicol, pero no se detectó ningún gen implicado. Tanto oxazolidinonas como fenicoles actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 50S del ribosoma, por lo que las mutaciones en el ARNr 23S y en las proteínas ribosomales detectadas en las cepas de esta especie podrían estar involucradas en la resistencia a fenicoles. Sin embargo, no se han encontrado datos referentes a esto en la bibliografía.

Se detectó un plásmido portador de los genes *fexA* y *cfz* en un aislado SARM. La estructura genética del entorno de ambos genes, incluyendo las transposasas *tnpA*, *tnpB* y *tnpC*, es similar a la variante del Tn558 detectada en el plásmido pSCFS7, originalmente descrito en una cepa SARM de origen clínico (GenBank FR675942) (Shore *et al.*, 2010). Plásmidos pSCFS7-tipo se han descrito en numerosas ocasiones en diferentes especies de estafilococos en varios países europeos, incluyendo

España (Feßler *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2018). Además, la primera cepa *S. epidermidis* portadora del gen *cfr* en España portaba los genes *fexA* y *cfr* en una estructura similar a la identificada en el pSCFS7 (Lozano *et al.*, 2012d). Aunque no se detectaron en este plásmido genes con función conjugativa, el plásmido fue transferido por conjugación. La transferencia de plásmidos pSCFS7-tipo por conjugación, incluso en ausencia de maquinaria conjugativa, ha sido descrita antes (Cafini *et al.*, 2016), lo que sugiere la presencia en estos plásmidos de otros mecanismos de transferencia horizontal, aún desconocidos.

En la cepa X1761, el gen *cfr* se transfirió exitosamente por conjugación a *S. aureus* ATCC® 29213, junto con el gen *fexA*. Los transconjugantes mostraron un perfil de resistencia acorde con el genotipo detectado por PCR. El gen *cfr* y *fexA* formaban parte de una variante del Tn558 descrita en el plásmido pSCFS3 de *S. aureus* (GenBank AM086211). Se ha descrito que la delección parcial de los genes codificantes de transposasas *tnpA* y *tnpB* en esta variante del Tn558, por la integración del elemento IS21-558, da lugar a una estructura sin capacidad de transposición (Kehrenberg y Schwarz, 2006). Por lo tanto, la transferencia del gen *cfr* por conjugación indica su posible localización plasmídica, lo que facilitaría su diseminación.

2.3. *Enterococcus* spp. LZD^R de muestras de aire de granjas porcinas

En las muestras de aire de la granja porcina PI se detectaron los aislados *E. faecium* C10004 y *E. faecium* C10009 LZD^R portadores de los genes *optrA* y *poxxA*. Aunque la primera descripción del gen *poxxA* fue en *S. aureus* (Antonelli *et al.*, 2018), este gen se ha detectado con mucha más frecuencia en el género *Enterococcus*. El gen *poxxA* ha sido descrito en enterococos y estafilococos de muestras clínicas, de animales de producción y animales de compañía, y en alimentos de origen animal (Antonelli *et al.*, 2018; D'Andrea *et al.*, 2019; Elghaieb *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019), pero esta es la primera descripción del gen en muestras ambientales. Además, también fue la primera descripción del gen *poxxA* en España aunque, actualmente, este gen también ha sido identificado en muestras clínicas de hospitales españoles en las especies *E. faecium* y *E. faecalis* (Moure *et al.*, 2020). Por el contrario, el gen *optrA* si ha sido detectado en muestras ambientales, incluyendo agua potable y aguas residuales (Dias *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2017). Los genes *poxxA* y especialmente *optrA*, están diseminados en las cepas de enterococos de origen ganadero en países como China, Túnez e Italia, posiblemente debido a la coselección de resistencias por el amplio uso de florfenicol y tetraciclina en la ganadería (Brenciani *et al.*, 2019; Elghaieb *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2017; He *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015b).

Aunque las mutaciones puntuales en el dominio V del ARNr 23S es el mecanismo más común de resistencia a linezolid en enterococos, en las cepas *E. faecium* C10004 y C10009 no se detectó ninguna mutación, ni tampoco cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales. Estas mutaciones están asociadas principalmente con el uso del linezolid en infecciones humanas (Meka *et al.*, 2004), pero se supone que estas cepas no están bajo la presión selectiva del linezolid, ya que su uso no está permitido en ganadería.

Las cepas *E. faecium* fueron tipadas como ST128 y ST437. Estas secuencias tipo no han sido descritas portando ambos genes de resistencia, pero si otras líneas genéticas como ST25, ST323 o

ST1 (Moure *et al.*, 2020). Esto sugiere que no existe una asociación entre la secuencia tipo y la presencia de los genes *poxxA* y *optrA*.

E. faecium C10004 y C10009 mostraron perfiles de multiresistencia, lo que ha sido descrito en numerosas ocasiones entre las cepas portadoras de estos genes de resistencia a linezolid, con altas tasas de resistencia a macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y tetraciclina (Elghaieb *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Moure *et al.*, 2020). Afortunadamente, las cepas fueron sensibles a otros antibióticos cruciales para el tratamiento de infecciones causadas por enterococos, pero existen varias descripciones de *E. faecium* procedentes de hospitales españoles que presentaban resistencia a linezolid y vancomicina (Moure *et al.*, 2020), lo que supone un importante riesgo sanitario.

El entorno genético del gen *poxxA* en las cepas C10004 y C10009 fue idéntico, con la detección del gen *flexB* y la secuencia de inserción IS1216. El alineamiento de los entornos genéticos de nuestras cepas con el de referencia de la cepa *E. faecium* P36 (GenBank KP834591), reveló que en P36 había una segunda copia de la secuencia de inserción aguas abajo del gen *flexB*, que estaba ausente en la cepa C10009. En la cepa C10004, debido a la longitud de la secuencia amplificada, no se pudo determinar la ausencia/presencia de esta segunda copia de la IS. En *E. faecium* P36, las dos copias de IS1216 flanquean el transposón compuesto Tn6256-tipo que contiene el gen de resistencia *flexB*. Como el entorno genético del gen *poxxA* en nuestras cepas solo pudo ser parcialmente analizado, no podemos confirmar que esa segunda copia de inserción esté totalmente ausente. Si esto fuera así, no podría ser movilizado como un transposón compuesto.

Las CMI de los transconjugantes portadores de los genes *poxxA* y *flexB*, y en el caso de TC-C10004 también de los genes *tet(L)* y *tet(M)*, son coherentes con el genotipo de resistencia detectado; sin embargo, en el caso del linezolid, el incremento de la CMI de los transconjugantes fue de una sola dilución, lo que debe ser interpretado con cautela, ya que también puede influir las variaciones inherentes al método. La transferibilidad del gen *poxxA*, junto con otros genes de resistencia, incluyendo *flexB*, *tet(L)* y *tet(M)*, ha sido previamente descrita debido a su localización en el mismo plásmido o transposón (Brenciani *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019). Esta colocalización podría contribuir a la coselección y diseminación del gen *poxxA*. Aunque la localización plasmídica o cromosómica del gen *poxxA* en la cepa C10009 no pudo ser determinado, el análisis de la secuenciación masiva del genoma permitió identificar un fragmento de ADN que contenía un gen *rep* y otros genes involucrados en la replicación plasmídica. Este fragmento fue idéntico a la respectiva secuencia del plásmido pC25-1 de *E. faecium* 27 (GenBank MH784601), que también portaba los genes *poxxA* y *flexB* (Hua *et al.*, 2018).

2.4. *Enterococcus* spp. LZD^R de origen clínico

Desde la primera descripción de una cepa de enterococo LZD^R en el año 2003, la detección de aislados del género *Enterococcus* LZD^R ha aumentado considerablemente en todo el mundo, incluyendo España (Bi *et al.*, 2018; Càmarà *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2018; Gawryszewska *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2018, 2014; Sassi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015b). La diseminación de la resistencia a linezolid en enterococos no es solo un problema en el ámbito clínico, sino también es una preocupación en el ámbito ganadero debido a la presencia de genes de resistencia transferibles, como se ha demostrado en esta tesis (Bi *et al.*, 2018; He *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015b).

Las mutaciones en el dominio V del ARNr 23S han sido consideradas como el mecanismo de resistencia a linezolid fundamental entre las cepas clínicas (Bi *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestras cepas y estudios anteriores han demostrado que los mecanismos de resistencia en el ámbito clínico están cambiando (Cai *et al.*, 2015; Càmara *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2018; Hua *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2017; Moure *et al.*, 2020; Sassi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2018).

En las cepas procedentes de hospitales españoles, solo se detectó resistencia a linezolid en las especies *E. faecalis* y *E. faecium*. Esto era de esperar ya que son las especies de enterococos asociadas a infecciones hospitalarias más frecuentes (Bi *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios anteriores habían referido la resistencia a linezolid en otras especies de enterococos como *E. thailandicus* y *E. gallinarum* (Cui *et al.*, 2016).

Los genes *optrA* y *cfr(D)* son los únicos genes de resistencia a linezolid detectados entre nuestras cepas clínicas, aunque los genes *cfr*, *cfr(B)* y *poxtA* han sido previamente descritos en cepas *E. faecalis* y *E. faecium* de origen clínico (Kuroda *et al.*, 2018; Papagiannitsis *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). Un estudio reciente en cepas de enterococos LZD^R de diferentes hospitales españoles reveló una alta prevalencia del gen *optrA* y la presencia de dos aislados portadores del gen *poxtA*, mientras que el gen *cfr* y sus variantes estaban ausentes (Moure *et al.*, 2020).

El gen *optrA* está ampliamente distribuido entre las cepas de *Enterococcus* spp. en diferentes países, pero está especialmente presente en China (Cai *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2018; Hua *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2018). En el caso concreto de España, más del 80% de las cepas *E. faecalis* LZD^R aisladas de hospitales españoles durante 2015-2018 portaban el gen *optrA* (Moure *et al.*, 2020). Generalmente, el gen *optrA* confiere bajos niveles de resistencia a linezolid (CMI 4-16 mg/L) (Cai *et al.*, 2015; Càmara *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2018; Gawryszewska *et al.*, 2017; Hua *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2018), lo que está en consonancia con los datos de obtenidos en esta tesis. En comparación con otros mecanismos de resistencia a linezolid, *OptrA* tiene una gran variabilidad, ya que se han descrito más de 20 variantes aminoacídicas diferentes en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de humanos, animales y alimentos. Además, se ha sugerido que algunas de estas variantes están asociadas con valores de CMI a linezolid más altos o bajos (Cai *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). En nuestras cepas, se detectaron los cambios aminoacídicos Y176D y T481P en *OptrA*, variante DP (ácido aspártico-prolina), en dos cepas *E. faecalis*. Esta variante ya ha sido descrita previamente en aislados *Enterococcus* spp. clínicos de China (Cai *et al.*, 2019, 2015; Cui *et al.*, 2016). Un estudio reciente, postula que los enterococos portadores de la variante DP de *OptrA* suelen tener una CMI a linezolid de 4 mg/L (Cai *et al.*, 2019); nuestras dos cepas portadoras de esa variante tenían CMIs de 8 mg/L. Otra de nuestras cepas *E. faecalis* portaba una nueva variante de *OptrA*, con el cambio aminoacídico T572P.

En la cepa *E. faecalis* X528 procedente del Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, se ha detectado por primera vez gen *cfr(D)* en la especie *E. faecalis*. Hasta la fecha, el gen *cfr(D)* solo había sido identificado en aislados clínicos de *E. faecium* de Francia y Australia, de las secuencias tipo ST17 y ST872 y, como la cepa identificada en esta tesis, portaban también el gen *optrA* (Guerin *et al.*, 2020;

Pang *et al.*, 2020). En la cepa *E. faecium* de origen francés, el gen *cfr(D)* estaba localizado en un plásmido conjugativo de 103 kb (Guerin *et al.*, 2020). Como se ha comentado anteriormente, Cfr(D) tiene una identidad aminoacídica de más de 60% con Cfr. Sin embargo, existe una controversia en relación a la contribución de este gen a la resistencia a linezolid, ya que solo confiere el fenotipo de resistencia PhLOPS_A cuando se expresa en *E. coli*, pero no en *E. faecalis* o *E. faecium* (Guerin *et al.*, 2020). Por esto, es dudoso si se le puede denominar gen de resistencia a linezolid, al menos, en *Enterococcus* spp.

La mutación puntual G2576T en el ARNr 23S es el principal mecanismo implicado en la resistencia a linezolid en las cepas *E. faecium* aisladas de los hospitales españoles en este estudio, lo que está en consonancia con trabajos previos (Deshpande *et al.*, 2018; Gawryszewska *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2014; Moure *et al.*, 2020). Al contrario que en las cepas *Staphylococcus* spp. clínicas, entre las cepas de *Enterococcus* spp. se detectó una baja frecuencia de cambios aminoacídicos. Por lo que sabemos, los cambios aminoacídicos que han sido detectados en los genes codificantes de la proteína ribosomal L4 (V109A y A114V) y L22 (A35T) en este estudio, no han sido identificados hasta la fecha en enterococos LZD^R. Se han descrito en varias ocasiones cambios en las proteínas ribosomales en cepas sensibles a linezolid (Hua *et al.*, 2018; Mendes *et al.*, 2014), por lo que no podemos saber si los cambios detectados en este estudio están asociados con resistencia a linezolid.

Las cepas *E. faecalis* LZD^R pertenecían a siete STs diferentes, con predominancia del ST480, ST585 y ST16, lo que concuerda con estudios previos en aislados clínicos portadores del gen *optrA* en España (Moure *et al.*, 2020) y en todo el mundo (Chen *et al.*, 2018; Sassi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015b). Sin embargo, no se identificó la secuencia tipo ST116, que es frecuente en cepas *E. faecalis* *optrA* positivos de diferentes orígenes (Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015b). Las cepas *E. faecalis* se agruparon en diferentes clústers del árbol filogenético según sus STs, pero llama especialmente la atención que entre las cepas C9737 y X526 aisladas de diferentes pacientes en el Hospital Verge de la Cinta de Tortosa, se identificaron solamente 11 SNPs de diferencia en su genoma, por lo que tendrían relación clonal.

En el caso de las cepas *E. faecium*, todos los aislados se adscribieron al subclado asociado al ámbito hospitalario A1, el genogrupo más importante de *E. faecium* relacionado con infecciones clínicas y responsable de brotes hospitalarios en todo el mundo (Lee *et al.*, 2019). Aunque las cepas caracterizadas carecían de mecanismos de resistencia transferibles, se han descrito numerosos aislados *E. faecium* de este subclado de origen humano y animal portando los genes *optrA* y *poxxA* (Moure *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015b).

Los fenotipos y genotipos de multiresistencia observados son comunes entre las cepas de *Enterococcus* spp. LZD^R (Chen *et al.*, 2018; Gawryszewska *et al.*, 2017); afortunadamente, todos los aislados fueron sensibles a daptomicina y vancomicina. La tasa de resistencia a macrólidos, lincosamidas y fluoroquinolonas fueron muy altas (>85%), lo que está en concordancia con estudios previos en cepas clínicas de enterococos LZD^R (Gawryszewska *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

Se ha confirmado que el gen *optrA* tiene una gran capacidad de diseminación entre bacterias Gram-positivas (Wang *et al.*, 2015b). En algunas ocasiones, el gen *optrA* se localiza en plásmidos conjugativos, que normalmente portan otros genes de resistencia a antibióticos, y es común encontrarlo

en combinación con el gen *fexA* (He *et al.*, 2016; Moure *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015b; Wu *et al.*, 2019). Asimismo, cuando el gen *optrA* se localiza en el ADN cromosómico, el gen *fexA* también se identifica en su entorno genético (He *et al.*, 2016; Sassi *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). En 12 de las 13 cepas clínicas *E. faecalis*, el gen *fexA* se localizaba aguas arriba del gen *optrA*; la cepa restante también portaba el gen *fexA* pero la secuencia del entorno genético no era lo suficientemente larga como para cubrir la presencia/ausencia del gen *fexA*. No se encontraron vestigios del transposón Tn558, donde se localiza habitualmente el gen *fexA* en estafilococos, en el entorno del gen *fexA* en ninguna de las cepas.

Cuando el gen *optrA* se localiza en plásmidos, la secuencia de inserción IS1216E se identifica frecuentemente aguas arriba y/o aguas abajo del gen *optrA* (Càmara *et al.*, 2019; He *et al.*, 2016; Moure *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2019); sin embargo, en las cepas estudiadas no se identificó ninguna IS en su entorno genético. Además, tampoco se detectó el regulador transcripcional *araC*, que se localiza frecuentemente justo aguas arriba del gen *optrA* cuando éste se localiza en el ADN cromosómico (Cai *et al.*, 2019; He *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019). Los genes *impB* y *tnp*, detectados en cuatro cepas, se identifican normalmente en el clúster de *optrA* de diferentes plásmidos, como en el plásmido pXY17 de la cepa *E. faecalis* XY17 (Genbank KT862780) (He *et al.*, 2016).

El fenotipo de resistencia de los transconjugantes está en concordancia con el genotipo detectado. La transferibilidad del gen *optrA* junto con otros genes de resistencia en 12 cepas *E. faecalis* sugiere su posible localización plasmídica. Además de *optrA*, el gen *erm(A)*-tipo fue detectado en los transconjugantes TC-9951 and TC-9952, lo que era esperable, ya que este gen se localizaba aguas abajo de *optrA* en ambas cepas. Los genes *tet(L)* y *tet(O)* se detectaron junto con *optrA*, *fexA* y *erm(A)*-tipo en el transconjugante TC-C9951. El análisis de la secuenciación masiva del genoma permitió identificar estos genes de resistencia a tetraciclina en el mismo contig en la cepa C9951. Este contig era idéntico, al igual que el contig que contenía los genes *optrA*, *fexA* y *erm(A)*-tipo, a las respectivas secuencias del plásmido pE508 de la cepa *Enterococcaceae* E508 (GenBank MK425645). Esto sugiere que estos cinco genes de resistencia podrían estar localizados en el mismo plásmido.

Aunque la transferencia conjunta de *optrA* y *cfr(D)* por conjugación ha sido descrita en *E. faecium* (Guerin *et al.*, 2020), en nuestro caso el gen *cfr(D)* no se transfirió. Esto puede deberse a que este gen se encuentre en el ADN cromosómico, o que se encuentre en un plásmido que no se haya transferido ya que se usó florfenicol para la selección de los transconjugantes y se ha demostrado que *cfr(D)* no confiere resistencia a este antibiótico en el género *Enterococcus* (Guerin *et al.*, 2020).

3. Factores de virulencia en *Staphylococcus* spp. de diferentes orígenes

SARM-AG

Ninguna de las cepas de SARM-AG de los complejos clonales CC9 o CC398 investigadas en esta tesis portaban los genes de virulencia estudiados, independientemente de que fueran aisladas de aves silvestres, muestras ambientales de granjas porcinas, animales de producción, animales de compañía o humanos. La razón por la que los fagos portadores de factores de virulencia no se detectan

comúnmente en cepas SARM-AG CC398 es todavía desconocida. Algunos autores han sugerido que puede deberse a la baja o nula susceptibilidad de SARM-CC398 a estos fagos o que pueden carecer del receptor implicado en la adsorción del fago o de un sitio de integración adecuado. También se ha planteado que esta línea genética podría poseer sistemas de defensa que degradarían en ADN del fago (Kraushaar *et al.*, 2017). De hecho, un estudio determinó que el profago Φ Sa3 portador de los genes del IEC no era estable en una cepa SARM-AG CC398 y necesitaba un fago auxiliar para la infección (Van der Mee-Marquet *et al.*, 2013).

No obstante, existen descripciones de cepas de SARM-AG portadoras de genes de virulencia importantes, como *lukS/F-PV*, *eta* y *tst* (Mama *et al.*, 2020). Las cepas SARM-CC398 portadoras de los genes codificantes de la LPV son relativamente comunes en China (Yu *et al.*, 2008), mientras que en Europa las descripciones de cepas con estas características son muy escasas (Cuny *et al.*, 2015; Stegger *et al.*, 2010; Welinder-Olsson *et al.*, 2008), y se trata de cepas de personas sin contacto aparente con ganado y asociadas al *spa* t034 (Cuny *et al.*, 2015; Welinder-Olsson *et al.*, 2008).

La ausencia del IEC en todos los casos era de prever, ya que no es común en las cepas adaptadas a animales, en comparación con las asociadas a humanos (Argudín *et al.*, 2018, 2011), aunque existen descripciones del sistema IEC en SARM-CC398 procedentes de animales, personal veterinario y humanos en diferentes países europeos (Argudín *et al.*, 2018; Cuny *et al.*, 2015; Dodémont *et al.*, 2019). La readquisición del sistema IEC en la línea genética SARM-AG CC398 puede suponer un riesgo ya que puede facilitar su salto de animales a humanos y su diseminación en la comunidad.

Tres cepas SARM-*mecC* del complejo clonal CC130 aisladas de aves silvestres portaban los genes *scn* y *sak*, y por lo tanto, fueron adscritas al IEC tipo E. La mayor parte de las cepas que han sido descritas anteriormente relacionadas con el gen *mecC* son *scn* negativos, aunque se han detectado algunas cepas aisladas de fauna silvestre en España que también contenían los genes del IEC tipo E (Gómez *et al.*, 2015, 2014). La presencia de cepas *mecC* positivas que contenían o carecían del gen *scn* sugiere diferentes estadios evolutivos en este linaje. El alelo *etd2* de la toxina exfoliativa *etd*, con el que comparte un 59% de identidad aminoacídica (Paterson *et al.*, 2014), se detectó en todas las cepas SARM-CC130 portadoras del gen *mecC*. Este gen parece ser ubicuo en las cepas del CC130, independientemente de su origen (Gómez *et al.*, 2017, 2015, 2014), aunque su localización genética no ha sido todavía descrita.

S. aureus de animales de compañía

En relación con las cepas *S. aureus* aisladas de animales de compañía con signos de infección, dos cepas SASM t045-ST5/CC5 portaron los genes del IEC tipo F (*scn*, *chp*, *sak*, *sep*), lo que sugiere una transmisión humano-animal (Gómez-Sanz *et al.*, 2013c, 2013d). Se ha demostrado que las proteínas codificadas por los genes *scn* y *chp* tienen una actividad significativamente reducida en el suero y los neutrófilos caninos, respectivamente. Sin embargo, en ensayos *in vitro*, la proteína Sak mejora la activación del plasminógeno canino, por lo que puede tener un papel importante en las infecciones en estos animales (Gladysheva *et al.*, 2003; Rooijackers *et al.*, 2005).

Una cepa SASM t10576-ST1660, aislada de un perro enfermo, portaba los genes de virulencia adaptados a equinos *lukPQ* y *scneq* (de Jong *et al.*, 2018; Koop *et al.*, 2017). Esta cepa fue la que

presentó las mismas características genéticas que la cepa aislada de un caballo en el mismo hospital veterinario (Gómez-Sanz *et al.*, 2014). La presencia de estos genes de adaptación al huésped equino, respalda la hipótesis de un posible origen equino y la posible transmisión de la cepa SASM entre diferentes especies animales en el hospital veterinario.

Por último, una cepa SASM t005-ST22/CC2 aislada de una infección respiratoria de un gato fue LPV-positiva. Las cepas *S. aureus* del linaje CC22, productoras de esta leucocidina, poseen relevancia en salud pública ya que este linaje ha estado implicado en brotes hospitalarios en todo el mundo, muy especialmente en su variante SARM (Gopal Rao *et al.*, 2019; Shore *et al.*, 2014).

Grupo SIG

En el 100% de las cepas *S. pseudintermedius* procedentes de animales de compañía, tanto SPSM como SPRM, se detectaron los genes codificantes de la leucocidina Luk-I, la exfoliatina SIET y la enterotoxina SE-INT. Un estudio reciente en aislados clínicos de perros, ha sugerido que no existen diferencias significativas en la detección de estas toxinas en los aislados SPRM (100%) y SPSM (98%) (Hritcu *et al.*, 2020). Estos genes de virulencia parecen ser ubicuos en cepas *S. pseudintermedius* independientemente de su origen, localización geográfica y tanto si se trata de portador asintomático como de infección (Börjesson *et al.*, 2015; Gómez-Sanz *et al.*, 2013b, 2011; van Duijkeren *et al.*, 2011). Un estudio reciente ha concluido que la leucocidina Luk-I está asociada con un profago incompleto que se encuentra en forma degenerada en todas las cepas *S. pseudintermedius* de los que se tiene el genoma (Abouelkhair *et al.*, 2018). En el caso de *siet* y *se-int*, su presencia generalizada quizás sea debido, en gran medida, a que se encuentran en regiones del genoma altamente conservadas. Esto pone de manifiesto la gran adaptación de *S. pseudintermedius* a su hospedador habitual.

Sin embargo, para la enterotoxina *sec_{canine}* sí que parecen encontrarse diferencias entre las cepas SPRM y SPSM, ya esta se detecta normalmente en SPSM (Gómez-Sanz *et al.*, 2013c; Hritcu *et al.*, 2020), y en tasas de prevalencia de alrededor del 10%, en concordancia con nuestros resultados.

La frecuencia de detección de los genes de las toxinas exfoliativas *expA* y *expB* en *S. pseudintermedius* es menor del 5%, lo que es consistente con otros estudios (Hritcu *et al.*, 2020). La prevalencia de estas toxinas exfoliativas es de hasta un 23% en cepas de *S. pseudintermedius* aisladas de pioderma canina, ya que estas toxinas están relacionadas con patologías de piel (Iyori *et al.*, 2011, 2010). Sin embargo, en esta tesis, ninguna de las cepas aisladas de infecciones del tegumento portaba los genes codificantes de estas toxinas.

Respecto a *S. delphini*, existen muy pocos estudios acerca del contenido en genes de virulencia en esta especie. Como hemos corroborado en esta tesis, *S. delphini* carece de genes de virulencia asociados normalmente a *S. aureus* (Sudagidan y Aydin, 2012). Sin embargo, independientemente de la especie animal de la que fueron aisladas, todas las cepas *S. delphini* de aves silvestres contenían los genes de virulencia *lukS-I*, *siet* y *se-int*, lo que está en consonancia con el contenido en genes de virulencia de cepas *S. delphini* de burros (Gharsa *et al.*, 2015). Los factores de virulencia LukF-I, LukS-I y SIET en las cepas *S. delphini*, tienen un alto porcentaje de identidad aminoacídica (más del 80%) con los respectivos de *S. pseudintermedius*, mientras que SE-INT solo tiene un 65% de identidad. Se desconoce el papel de estos factores de virulencia en la patogénesis de la especie *S. delphini*.

SCoN

Aparte de su potencial enterotoxigénico, en las cepas SCoN no se suele investigar la presencia de otros factores de virulencia. Sin embargo, en esta tesis hemos detectado en SCoN genes codificantes de factores de virulencia asociados generalmente con *S. aureus*.

Dos cepas de la especie *S. sciuri*, aisladas de muestras traqueales de dos buitres negros, eran portadoras del gen *tst* codificante de la TSST-1. Este gen se localiza en SaPIs y su movilidad está mediada por diferentes fagos (Novick y Ram, 2017). En estudios previos se ha descrito la presencia del gen *tst* en cepas *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* y *S. xylosum* de muestras de leche (Bertelloni *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2017), pero también en cepas clínicas de *S. epidermidis* (Giormezis *et al.*, 2014). Sin embargo, esta es la primera descripción en cepas SCoN de origen animal.

Una cepa *S. simulans* aislada del aire de la granja porcina PSE contenía los genes codificantes de la LPV (lukS/F-PV). Estos genes son portados por diferentes fagos, y algunos de ellos (p.ej. Φ Sa2mw, Φ PVL y Φ SLT) están asociados con la integrasa Sa2int (Goerke *et al.*, 2009), que se detectó en la cepa *S. simulans*. Pocos estudios existen acerca de la presencia de los genes de la LPV en SCoN y, hasta la fecha, solo han sido identificados en *S. haemolyticus*, *S. simulans* y *S. warneri* de muestras de mastitis bovina (Ünal y Çinar, 2012) y en *S. epidermidis* de origen clínico (Halaji *et al.*, 2017).

La toxina exfoliativa *eta*, se detectó en tres cepas *S. cohnii* aisladas de las muestras de aire de la granja porcina PI. Este gen de virulencia se ha detectado en varias especies de SCoN como *S. carnosus* y *S. equorum* de productos alimentarios y de muestras clínicas (Zell *et al.*, 2008). Sin embargo, el gen *eta* no fue detectado en las cepas *S. aureus* aisladas de esta granja.

Todos estos factores de virulencia encontrados en SCoN, están asociados con bacteriófagos, bien porque son codificados por fagos o porque su transferencia está vehiculizada por ellos. Se necesitaría la caracterización genética completa de las cepas para comprender mejor la adsorción de bacteriófagos de *S. aureus* por determinadas especies de SCoN.

Conclusiones

Conclusions



1. Se detecta una frecuencia moderada de colonización traqueal por SCoP en aves silvestres (8,3%), identificándose las especies *S. aureus* y *S. delphini*.
2. Los buitres negros y las urracas son portadores de cepas SARM-*mecC* (4,5%), lo que indica que algunas especies de aves silvestres pueden considerarse reservorio y actuar como vía de transmisión de este determinante de resistencia a meticilina.
3. Se detecta una alta frecuencia de colonización por SCoN en aves silvestres (60%), identificándose 11 especies diferentes, y siendo *S. sciuri* y *S. lentus* las predominantes. Se evidencian altas tasas de multiresistencia (38%) y de resistencia a meticilina (24%) entre los aislados SCoN. Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las cepas podrían tener su origen en la alimentación en vertederos o de animales de producción, poniendo de manifiesto la transmisión de microorganismos entre el entorno humano, animal y ambiental.
4. Se detecta SARM-CC398 con un perfil de multiresistencia en las muestras de aire de la granja de producción porcina intensiva, lo que supone un posible riesgo de colonización en ganaderos y corrobora el papel del aire en la diseminación de esta línea genética en el medio ambiente.
5. El sistema de producción de las granjas porcinas puede tener un impacto en las tasas de resistencia a algunos antibióticos. La detección de numerosos genes de resistencia en SCoN, algunos de ellos a antibióticos de gran relevancia clínica, destaca el valor epidemiológico de SCoN como reservorio y posible vía de transmisión de genes de resistencia a otras especies con mayor potencial patogénico, como *S. aureus*.
6. SARM-CC398 es el linaje mayoritario (87%) en los aislados *S. aureus* de cerdos con signos de infección, lo que apoya la importancia de esta línea genética como patógeno oportunista en estos animales.
7. Se aislaron importantes clones epidémicos de SARM (CC398) y SPRM (ST71, ST68 y ST258) en infecciones de animales de compañía, lo que evidencia el papel de las mascotas en la transmisión de estos clones de SCoP multiresistentes.
8. Las granjas porcinas desempeñan un papel importante en la diseminación de bacterias LZD^R en el medio ambiente a través del aire (pudiendo dispersarse a más de 100 metros de la granja), incluyendo SCoN portadores del gen *cfr* y *E. faecium* con los genes *optrA* y *poxTA*.
9. La detección del gen *cfr* en aislados SARM-CC398 LZD^R de origen humano y animal, hallazgo muy inusual, es de interés de salud pública debido a su posible diseminación en la interfaz animal-hombre.
10. La diseminación en hospitales españoles de cepas de SARM ST2-SCC*mecIII*, resistentes a linezolid por mutaciones en diferentes sitios diana de las oxazolidinonas, constituye un riesgo emergente en salud humana.
11. La resistencia a linezolid en aislados clínicos de *E. faecium* se atribuye a mutaciones en el dominio V del ARNr 23S, mientras que en *E. faecalis* se asocia a la presencia del gen *optrA*.
12. Se detectan factores de virulencia de gran relevancia (*lukS/F-PV*, *tst*, *eta*) en cepas de SCoN de origen ambiental y animal, lo que corrobora la adsorción de los bacteriófagos de *S. aureus* por

determinadas especies de SCoN y hace necesaria la vigilancia de los microorganismos de estos ambientes.

13. La detección de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia de gran relevancia clínica en estafilococos de animales (silvestres, de producción o de compañía) y en muestras del entorno ganadero, pone de manifiesto la importancia de estudios desde un enfoque *One Health*.

1. A moderate rate of CoPS tracheal carriage was detected among free-living birds (8.3%), identifying the species *S. aureus* and *S. delphini*.
2. Cinereous vultures and magpies are MRSA-*mecC* carriers (4.5%), which states that some species of wild birds could act as reservoir and vehicle of transmission of this methicillin resistance determinant.
3. A high frequency of CoNS colonization was detected in wild birds (60%), with 11 different species detected, being *S. sciuri* and *S. lentus* the predominant ones. High multiresistance (38%) and methicillin resistance rates (24%) were found among CoNS. The obtained results suggest that foraging on landfills or scavenging on livestock could be a potential source of some isolates, indicating the transmission of these microorganisms in the human, animal and environmental settings.
4. Multiresistant MRSA-CC398 strains were detected in the air samples from the intensive production pig-farm, which involves a potential risk for colonization in farm workers and corroborates the role of the air in the spread of this genetic lineage in the environment.
5. The production system of swine farm is a factor that seems to contribute to the resistance rates detected for some antimicrobials. The detection of several resistance genes among CoNS, some of them conferring resistance to clinically relevant antimicrobials, highlights the epidemiological value of CoNS as potential reservoir and vehicle of antimicrobial resistance gene transmission to more pathogenic bacteria, such as *S. aureus*.
6. MRSA CC398 is the predominant lineage (87%) among *S. aureus* of pigs with signs of infection, which supports the importance of this genetic lineage as an opportunistic pathogen in these animals.
7. Important epidemic clones of MRSA (CC398) and MRSP (ST71, ST68 and ST258) were recovered from infections in companion animals, which emphasizes the role of pets in the transmission of these multiresistant CoPS clones.
8. Swine farms play a key role in the dissemination of LZD^R bacteria to the environment through the air (which could be dispersed more than 100 meters outside the farm), including *cfp*-carrying CoNS and *optrA*- and *poxtA*-carrying *E. faecium* isolates.
9. The presence of the *cfp* gene in LZD^R MRSA-CC398 isolates of human and animal origins, a very unusual finding, is of public health concern due to its possible dissemination in the animal-human interface.
10. The dissemination of MRSE ST2-SCC*mecIII* in Spanish hospitals showing linezolid resistance due to changes in different oxazolidinones target sites, is an emerging risk for human health.
11. Among clinical isolates, linezolid resistance in *E. faecium* is attributable to point mutations in the domain V of the rRNA 23S, while in *E. faecalis* is associated with the presence of the *optrA* gene.
12. Virulence factors of great importance (*lukS/F-PV*, *tst*, *eta*) were detected among CoNS of animal and environmental origin, which corroborates the *S. aureus* bacteriophage adsorption to certain species of CoNS and makes necessary the monitorization of the microorganisms in these settings.

13. The detection of clinically relevant antibiotic resistance and virulence genes among staphylococci recovered from animals (free-living, food production and companion animals) and from the livestock environment, evidences the importance of studies through a One Health approach.

Referencias



- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B.**, 2000. 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.* 37, 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(00\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(00)00130-9)
- Abouelkhair, M.A., Bemis, D.A., Giannone, R.J., Frank, L.A., Kania, S.A.**, 2018. Characterization of a leukocidin identified in *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS One* 13, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204450>
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., Gonzalez-Rocha, G.**, 2018. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev. Chil. Infectol.* 35, 7–14.
- Aires-de-Sousa, M.**, 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>
- Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdeňková, K., Demnerová, K.**, 2014. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5005–5018. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3367-3>
- Andreis, S.N., Perreten, V., Schwendener, S.**, 2017. Novel β -Lactamase *bla*_{ARL} in *Staphylococcus arlettae*. *mSphere* 2, 3–8. <https://doi.org/10.1128/msphere.00117-17>
- Andrey, D.O., Renzoni, A., Monod, A., Lew, D.P., Cheung, A.L., Kelley, W.L.**, 2010. Control of the *Staphylococcus aureus* toxic shock *tst* promoter by the global regulator SarA. *J. Bacteriol.* 192, 6077–6085. <https://doi.org/10.1128/JB.00146-10>
- Anjum, M.F., Marco-Jimenez, F., Duncan, D., Marín, C., Smith, R.P., Evans, S.J.**, 2019. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from animals and animal products in the UK. *Front. Microbiol.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02136>
- Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P.E., Rossolini, G.M.**, 2018. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1763–1769. <https://doi.org/10.1093/jac/dky088>
- Araújo, M.B., Lobo, J.M., Moreno, J.C.**, 2007. The effectiveness of Iberian protected areas in conserving terrestrial biodiversity. *Conserv. Biol.* 21, 1423–1432. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2007.00827.x>
- Argudín, M.A., Deplano, A., Vandendriessche, S., Dodémont, M., Nonhoff, C., Denis, O., Roisin, S.**, 2018. CC398 *Staphylococcus aureus* subpopulations in Belgian patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 911–916. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3205-y>
- Argudín, M.A., Fetsch, A., Tenhagen, B.A., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Kowall, J., Rodicio, M.R., Käsbohrer, A., Helmuth, R., Schroeter, A., Mendoza, M.C., Bräunig, J., Appel, B., Guerra, B.**, 2010. High heterogeneity within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and *spa* and SCC*mec* types. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 652–658. <https://doi.org/10.1128/AEM.01721-09>

- Argudín, M.A., Tenhagen, B.A., Fetsch, A., Sachsenröder, J., Käsbohrer, A., Schroeter, A., Hammer, J.A., Hertwig, S., Helmuth, R., Bräunig, J., Mendoza, M.C., Appe, B., Rodicio, M.R., Guerra, B.,** 2011. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3052–3060. <https://doi.org/10.1128/AEM.02260-10>
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formis, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O.,** 2008. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bakthavatchalam, Y.D., Nabarro, L.E.B., Ralph, R., Veeraraghavan, B.,** 2017. Diagnosis and management of Panton-Valentine leukocidin toxin associated *Staphylococcus aureus* infection: an update. *Virulence* 5594. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1362532>
- Bal, A.M., Coombs, G.W., Holden, M.T.G., Lindsay, J.A., Nimmo, G.R., Tattavin, P., Skov, R.L.,** 2016. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 6, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.004>
- Ballhausen, B., Kriegeskorte, A., van Alen, S., Jung, P., Köck, R., Peters, G., Bischoff, M., Becker, K.,** 2017. The pathogenicity and host adaptation of livestock-associated MRSA CC398. *Vet. Microbiol.* 200, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.006>
- Bannoehr, J., Ben Zakour, N.L., Waller, A.S., Guardabassi, L., Thoday, K.L., Van Den Broek, A.H.M., Fitzgerald, J.R.,** 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: Insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.* 189, 8685–8692. <https://doi.org/10.1128/JB.01150-07>
- Bannoehr, J., Guardabassi, L.,** 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol.* 23, 253-266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>
- Baos, E., Candell, F.J., Merino, P., Pena, I., Picazo, J.J.,** 2013. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.002>
- Battisti, A., Franco, A., Merialdi, G., Hasman, H., Iurescia, M., Lorenzetti, R., Feltrin, F., Zini, M., Aarestrup, F.M.,** 2010. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet. Microbiol.* 142, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.008>
- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G.,** 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Becker, K., van Alen, S., Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G.,** 2018. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 242–248. <https://doi.org/10.3201/eid2402.171074>

- Bender, J., Strommenger, B., Steglich, M., Zimmermann, O., Fenner, I., Lensing, C., Dagwadordsch, U., Kekulé, A.S., Werner, G., Layer, F.,** 2015. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1630–1638. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv025>
- Bender, J.K., Fleige, C., Klare, I., Fiedler, S., Mischnik, A., Mutters, N.T., Dingle, K.E., Werner, G.,** 2016. Detection of a *cfr*(B) variant in German *Enterococcus faecium* clinical isolates and the impact on linezolid resistance in *Enterococcus* spp. *PLoS One* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167042>
- Benito, D., Gómez, P., Aspiroz, C., Zarazaga, M., Lozano, C., Torres, C.,** 2015. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.008>
- Benito, D., Gómez, P., Lozano, C., Estepa, V., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., Torres, C.,** 2014. Genetic lineages, antimicrobial resistance, and virulence in *Staphylococcus aureus* of meat samples in Spain: Analysis of immune evasion cluster (IEC) genes. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 354–356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1689>
- Bens, C.C.P.M., Voss, A., Klaassen, C.H.W.,** 2006. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1875–1876. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1875-1876.2006>
- Bergot, M., Martins-Simoes, P., Kilian, H., Châtre, P., Worthing, K.A., Norris, J.M., Madec, J.Y., Laurent, F., Haenni, M.,** 2018. Evolution of the population structure of *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Front. Microbiol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03055>
- Bernier Gosselin, V., Dufour, S., Adkins, P.R.F., Middleton, J.R.,** 2019. Persistence of coagulase negative staphylococcal intramammary infections in dairy goats. *J. Dairy Res.* 86, 211–216. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000311>
- Bertelloni, F., Fratini, F., Ebani, V.V., Galiero, A., Turchi, B., Cerri, D.,** 2015. Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. *Dairy Sci. Technol.* 341–352. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0214-9>
- Besier, S., Ludwig, A., Zander, J., Brade, V., Wichelhaus, T.A.,** 2008. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: Gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1570–1572. <https://doi.org/10.1128/AAC.01098-07>
- Bi, R., Qin, T., Fan, W., Ma, P., Gu, B.,** 2018. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 13, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.018>
- Bialvaei, A.Z., Rahbar, M., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Kafil, H.S.,** 2017. Linezolid: A promising option in the treatment of Gram-positives. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 354–364. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw450>

- Bierowiec, K., Korzeniowska-Kowal, A., Wzorek, A., Rypuła, K., Gamian, A.,** 2019. Prevalence of *Staphylococcus* species colonization in healthy and sick cats. *Biomed Res. Int.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4360525>
- Bonnedahl, J., Järhult, J.D.,** 2014. Antibiotic resistance in wild birds. *Ups. J. Med. Sci.* 119, 113–116. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>
- Börjesson, S., Gómez-Sanz, E., Ekström, K., Torres, C., Grönlund, U.,** 2015. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 839–844. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2300-y>
- Bozdogan, B., Berzougua, L., Kou, M.S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq, R.,** 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925–929. <https://doi.org/10.1128/aac.43.4.925>
- Brenciani, A., Fioriti, S., Morroni, G., Cucco, L., Morelli, A., Pezzotti, G., Paniccià, M., Antonelli, A., Magistrali, C.F., Rossolini, G.M., Giovanetti, E.,** 2019. Detection in Italy of a porcine *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxtA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1–2. <https://doi.org/10.1093/jac/dky505>
- Brenciani, A., Morroni, G., Pollini, S., Tiberi, E., Mingoia, M., Varaldo, P.E., Rossolini, G.M., Giovanetti, E.,** 2016. Characterization of novel conjugative multiresistance plasmids carrying *cfr* from linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 307–313. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv341>
- Broens, E.M., Graat, E.A.M., Van der Wolf, P.J., Van de Giessen, A.W., Van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., Van Nes, A., Mevius, D.J., de Jong, M.C.M.,** 2011. MRSA CC398 in the pig production chain. *Prev. Vet. Med.* 98, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.10.010>
- Bukowski, M., Wladyka, B., Dubin, G.,** 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)* 2, 1148–1165. <https://doi.org/10.3390/toxins2051148>
- Butaye, P., Argudín, M.A., Smith, T.C.,** 2016. Livestock-associated MRSA and its current evolution. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 3, 19–31. <https://doi.org/10.1007/s40588-016-0031-9>
- Cafini, F., Nguyen, L.T.T., Higashide, M., Román, F., Prieto, J., Morikawa, K.,** 2016. Horizontal gene transmission of the *cfr* gene to MRSA and *Enterococcus*: Role of *Staphylococcus epidermidis* as a reservoir and alternative pathway for the spread of linezolid resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 587–592. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv391>
- Cafini, F., Thi Le Thuy, N., Román, F., Prieto, J., Dubrac, S., Msadek, T., Morikawa, K.,** 2017. Methodology for the study of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus*. *J. Vis. Exp.* 2017, 1–7. <https://doi.org/10.3791/55087>
- Cai, J., Schwarz, S., Chi, D., Wang, Z., Zhang, R., Wang, Y.,** 2019. Faecal carriage of *optrA*-positive enterococci in asymptomatic healthy humans in Hangzhou, China. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 630.e1-630.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.025>
- Cai, J., Wang, Y., Schwarz, S., Lv, H., Li, Y., Liao, K., Yu, S., Zhao, K., Gu, D., Wang, X., Zhang, R., Shen, J.,** 2015. Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from

- hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010-2014. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 1095.e1-1095.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.08.007>
- Calvo, J., Martínez-Martínez, L.**, 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Càmara, J., Camoez, M., Tubau, F., Pujol, M., Ayats, J., Ardanuy, C., Domínguez, M.Á.**, 2019. Detection of the novel *optrA* gene among linezolid-resistant enterococci in Barcelona, Spain. *Microb. Drug Resist.* 25, 87–93. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0028>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., Hasman, H.**, 2014. *In Silico* detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Ceballos, S., Aspiroz, C., Ruiz-Ripa, L., Reynaga, E., Azcona-Gutiérrez, J.M., Rezusta, A., Seral, C., Antoñanzas, F., Torres, L., López, C., López-Cerero, L., Cercenado, E., Zarazaga, M., Torres, C.**, 2019. Epidemiology of MRSA CC398 in hospitals located in Spanish regions with different pig-farming densities: a multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2157–2161. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz180>
- Ceballos, S., Aspiroz, C., Ruiz-Ripa, L., Zarazaga, M., Torres, C.**, 2020. Antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates from Spanish hospitals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 105907. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105907>
- Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G.**, 2005. *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukicidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 115, 3117–3127. <https://doi.org/10.1172/JCI22684>.toxin
- Chamon, R.C., Iorio, N.L.P., Cavalcante, F.S., da Silva Teodoro, C.R., de Oliveira, A.P.C., Maia, F., dos Santos, K.R.N.**, 2014. Linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*: Single and double mutations at the domain V of 23S rRNA among isolates from a Rio de Janeiro hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 80, 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.011>
- Chanchaithong, P., Perreten, V., Am-In, N., Lugsomya, K., Tummaruk, P., Prapasarakul, N.**, 2019. Molecular characterization and antimicrobial resistance of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pigs and swine workers in central Thailand. *Microb. Drug Resist.* 25, 1382–1389. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0011>
- Chanchaithong, P., Prapasarakul, N., Perreten, V., Schwendener, S.**, 2016. Characterization of a novel composite staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 1153–1157. <https://doi.org/10.1128/AAC.02268-15>
- Chen, H.J., Hung, W.C., Tseng, S.P., Tsai, J.C., Hsueh, P.R., Teng, L.J.**, 2010. Fusidic acid resistance determinants in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4985–4991. <https://doi.org/10.1128/AAC.00523-10>

- Chen, M., Pan, H., Lou, Y., Wu, Z., Zhang, J., Huang, Y., Yu, W., Qiu, Y.,** 2018. Epidemiological characteristics and genetic structure of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*. *Infect. Drug Resist.* 11, 2397–2409. <https://doi.org/10.2147/IDR.S181339>
- Chen, S., Wang, Y., Chen, F., Yang, H., Gan, M., Zheng, S.J.,** 2007. A highly pathogenic strain of *Staphylococcus sciuri* caused fatal exudative epidermitis in piglets. *PLoS One* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000147>
- Cheung, G.Y.C., Joo, H.-S., Chatterjee, S.S., Otto, M.,** 2014. Phenol-soluble modulins – critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 38, 698–719. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12057>
- Chuang, Y.Y., Huang, Y.C.,** 2015. Livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia: An emerging issue? *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.007>
- Clark, N.C., Olsvik, Ø., Swenson, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F.C.,** 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 157–160. <https://doi.org/10.1128/aac.43.1.157>
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute,** 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA.
- CA-SFM, Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie,** 2013. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie- Recommandation 2013.
- Costa, Y., Galimand, M., Leclercq, R., Duval, J., Courvalin, P.,** 1993. Characterization of the chromosomal *aac(6')*-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1896–1903. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.9.1896>
- Couto, N., Belas, A., Kadlec, K., Schwarz, S., Pomba, C.,** 2015. Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2483–2487. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv141>
- Couto, N., Monchique, C., Belas, A., Marques, C., Gama, L.T., Pomba, C.,** 2016. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1479–1487. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw029>
- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A., Guardabassi, L.,** 2011. Short Communication: Prevalence of meticillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Vet. Rec.* 169. <https://doi.org/10.1136/vr.c6948>
- Cui, L., Wang, Y., Lv, Y., Wang, S., Song, Y., Li, Y., Liu, J., Xue, F., Yang, W., Zhang, J.,** 2016. Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 7490–7493. <https://doi.org/10.1128/AAC.01256-16>
- Cuny, C., Abdelbary, M., Layer, F., Werner, G., Witte, W.,** 2015. Prevalence of the immune evasion gene cluster in *Staphylococcus aureus* CC398. *Vet. Microbiol.* 177, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.031>

- Cuny, C., Arnold, P., Hermes, J., Eckmanns, T., Mehraj, J., Schoenfelder, S., Ziebuhr, W., Zhao, Q., Wang, Y., Feßler, A.T., Krause, G., Schwarz, S., Witte, W., 2017.** Occurrence of *cfr*-mediated multiresistance in staphylococci from veal calves and pigs, from humans at the corresponding farms, and from veterinarians and their family members. *Vet. Microbiol.* 200, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.002>
- Cuny, C., Layer, F., Strommenger, B., Witte, W., 2011.** Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024360>
- D'Andrea, M.M., Antonelli, A., Brenciani, A., Di Pilato, V., Morroni, G., Pollini, S., Fioriti, S., Giovanetti, E., Rossolini, G.M., 2019.** Characterization of Tn6349, a novel mosaic transposon carrying *poxTA*, *cfr* and other resistance determinants, inserted in the chromosome of an ST5-MRSA-II strain of clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz278>
- Dahl, K.H., Simonsen, G.S., Olsvik, Ø., Sundsfjord, A., 1999.** Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1105–1110. <https://doi.org/10.1128/aac.43.5.1105>
- Davies, J.E., Behroozian, S., 2020.** An ancient solution to a modern problem. *Mol. Microbiol.* 113, 546–549. <https://doi.org/10.1111/mmi.14481>
- de Almeida, L.M., De Araújo, M.R.E., Sacramento, A.G., Pavez, M., De Souza, A.G., Rodrigues, F., Gales, A.C., Lincopan, N., Sampaio, J.L.M., Mamizuka, E.M., 2013.** Linezolid resistance in brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23s rRNA ribosomal mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4082–4083. <https://doi.org/10.1128/AAC.00437-13>
- de Almeida, L.M., Lincopan, N., de Araújo, M.R.E., Mamizuka, E.M., 2012.** Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutation in the 23s rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 768–769. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr538>
- de Jong, N.W.M., Vrieling, M., Garcia, B.L., Koop, G., Brettmann, M., Aerts, P.C., Ruyken, M., Van Strijp, J.A.G., Holmes, M., Harrison, E.M., Geisbrecht, B. V., Rooijackers, S.H.M., 2018.** Identification of a staphylococcal complement inhibitor with broad host specificity in equid *Staphylococcus aureus* strains. *J. Biol. Chem.* 293, 4468–4477. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000599>
- de Martino, L.D., Lucido, M., Mallardo, K., Facello, B., Mallardo, M., Iovane, G., Pagnini, U., Tufano, M.A., Catalanotti, P., 2010.** Methicillin-resistant staphylococci isolated from healthy horses and horse personnel in Italy. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 22, 77–82. <https://doi.org/10.1177/104063871002200114>
- Deng, F., Wang, H., Liao, Y., Li, J., Feßler, A.T., Michael, G.B., Schwarz, S., Wang, Y., 2017.** Detection and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance genes in staphylococci isolated from pets. *Front. Microbiol.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00234>
- Deshpande, L.M., Ashcraft, D.S., Kahn, H.P., Pankey, G., Jones, R.N., Farrell, D.J., Mendes, R.E., 2015.** Detection of a new *cfr*-like gene, *cfr(B)*, in *Enterococcus faecium* isolates recovered from

- human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6256–6261. <https://doi.org/10.1128/AAC.01473-15>
- Deshpande, L.M., Castanheira, M., Flamm, R.K., Mendes, R.E.,** 2018. Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2314–2322. <https://doi.org/10.1093/jac/dky188>
- Dias, M.F., da Rocha Fernandes, G., de Paiva, M.C., de Matos Salim, A.C., Santos, A.B., Nascimento, A.M.A.,** 2020. Exploring the resistome, virulome and microbiome of drinking water in environmental and clinical settings. *Water Res.* 174. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115630>
- Diaz, L., Kiratisin, P., Mendes, R.E., Panesso, D., Singh, K. V., Arias, C.A.,** 2012. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3917–3922. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-12>
- Dibo, I., Pillai, S.K., Gold, H.S., Baer, M.R., Wetzler, M., Slack, J.L., Hazamy, P.A., Ball, D., Hsiao, C. Bin, McCarthy, P.L., Segall, B.H.,** 2004. Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from a cord blood transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1843–1845. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1843-1845.2004>
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M.,** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16–34.
- Dodémont, M., Argudín, M.A., Willekens, J., Vanderhelst, E., Pierard, D., Miendje Deyi, V.Y., Hanssens, L., Franckx, H., Schelstraete, P., Leroux-Roels, I., Nonhoff, C., Deplano, A., Knoop, C., Malfroot, A., Denis, O.,** 2019. Emergence of livestock-associated MRSA isolated from cystic fibrosis patients: Result of a Belgian national survey. *J. Cyst. Fibros.* 18, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.04.008>
- Donázar, J.A., Margalida, A., Carrete, A., Sánchez-Zapata, J.A.,** 2009. Too sanitary for vultures. *Science* 326, 664. https://doi.org/10.1126/science.326_664a
- Duim, B., Verstappen, K.M., Broens, E.M., Laarhoven, L.M., Van Duijkeren, E., Hordijk, J., de Heus, P., Spaninks, M., Timmerman, A.J., Wagenaar, J.A.,** 2016. Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and dissemination of antimicrobial-resistant phenotypes in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 54, 283–288. <https://doi.org/10.1128/JCM.01288-15>
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control,** 2019. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. <https://doi.org/10.2900/22212>
- Edwards, V.M., Deringer, J.R., Callantine, S.D., Deobald, C.F., Berger, P.H., Kapur, V., Stauffacher, C.V., Bohach, G.A.,** 1997. Characterization of the canine type c enterotoxin produced by *Staphylococcus intermedius* pyoderma isolates. *Infect. Immun.* 65, 2346–2352. <https://doi.org/10.1128/iai.65.6.2346-2352.1997>
- El-Ashker, M., Gwida, M., Monecke, S., El-Gohary, F., Ehricht, R., Elsayed, M., Akinduti, P., El-Fateh, M., Maurischat, S.,** 2020. Antimicrobial resistance pattern and virulence profile of *S. aureus* isolated

- from household cattle and buffalo with mastitis in Egypt. *Vet. Microbiol.* 240, 108535. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108535>
- Elghaieb, H., Freitas, A.R., Abbassi, M.S., Novais, C., Zouari, M., Hassen, A., Peixe, L.**, 2019. Dispersal of linezolid-resistant enterococci carrying *poxxA* or *optrA* in retail meat and food-producing animals from Tunisia. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2865–2869. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz263>
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G.**, 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1008-1015.2000>
- EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility**, 2019. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0 7.1, 1–94.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G.**, 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J. Bacteriol.* 186, 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>
- Ferreira, J.P., Anderson, K.L., Correa, M.T., Lyman, R., Ruffin, F., Reller, L.B., Fowler, V.G.**, 2011. Transmission of MRSA between companion animals and infected human patients presenting to outpatient medical care facilities. *PLoS One* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026978>
- Feßler, A.T., Calvo, N., Gutiérrez, N., Bellido, J.L.M., Fajardo, M., Garduno, E., Monecke, S., Ehricht, R., Kadlec, K., Schwarz, S.**, 2014. Cfr-mediated linezolid resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with clinical infections in humans: Two case reports. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 268–270. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt331>
- Feßler, A.T., Kadlec, K., Wang, Y., Zhang, W., Wu, C., Shen, J., Schwarz, S., Butaye, P.R.**, 2018a. Small antimicrobial resistance plasmids in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398. *Front. Microbiol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02063>
- Feßler, A.T., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Schwarz, S.**, 2018b. Antimicrobial resistance properties of *Staphylococcus aureus*, in: *Staphylococcus aureus*. Elsevier Inc., pp. 57–85. doi:10.1016/b978-0-12-809671-0.00004-8
- Feßler, A.T., Olde Riekerink, R.G.M., Rothkamp, A., Kadlec, K., Sampimon, O.C., Lam, T.J.G.M., Schwarz, S.**, 2012. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. *Vet. Microbiol.* 160, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.005>
- Fetsch, A., Kraushaar, B., Käsbohrer, A., Hammerl, J.A.**, 2017. Turkey meat as source of CC9/ CC398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans? *Clin. Infect. Dis.* 64, 102–103. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw687>
- Fines, M., Leclercq, R.**, 2000. Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 797–802. <https://doi.org/10.1093/jac/45.6.797>

- Foster, A.P.**, 2012. Staphylococcal skin disease in livestock. *Vet. Dermatol.* 23, 342–352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01093.x>
- Freitas, A.R., Elghaieb, H., León-Sampedro, R., Abbassi, M.S., Novais, C., Coque, T.M., Hassen, A., Peixe, L.**, 2017. Detection of *optrA* in the African continent (Tunisia) within a mosaic *Enterococcus faecalis* plasmid from urban wastewaters. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3245–3251. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx321>
- Freitas, A.R., Tedim, A.P., Duarte, B., Elghaieb, H., Abbassi, M.S., Hassen, A., Read, A., Alves, V., Novais, C., Peixe, L.**, 2020. Linezolid-resistant (Tn6246:*fexB-poxA*) *Enterococcus faecium* strains colonizing humans and bovines on different continents: similarity without epidemiological link. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 2416–2423. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa227>
- Frénay, H.M.E., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., Van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Verhoef, J., Mooi, F.R.**, 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 60–64. <https://doi.org/10.1007/BF01586186>
- Friesenegger, A., Fiedler, S., Devriese, L.A., Wirth, R.**, 1991. Genetic transformation of various species of *Enterococcus* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 323–327. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04549.x>
- Futagawa-Saito, K., Makino, S., Sunaga, F., Kato, Y., Sakurai-Komada, N., Ba-Thein, W., Fukuyasu, T.**, 2009. Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 301, 176–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01823.x>
- Futagawa-Saito, K., Sugiyama, T., Karube, S., Sakurai, N., Ba-Thein, W., Fukuyasu, T.**, 2004a. Prevalence and characterization of leukotoxin-producing *Staphylococcus intermedius* in isolates from dogs and pigeons. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5324–5326. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5324-5326.2004>
- Futagawa-Saito, K., Suzuki, M., Ohsawa, M., Ohshima, S., Sakurai, N., Ba-Thein, W., Fukuyasu, T.**, 2004b. Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, *se-int*, in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1361–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02264.x>
- García-Álvarez, L., Holden, M.T.G., Lindsay, H., Webb, C.R., Brown, D.F.J., Curran, M.D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, D.J., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, S.D., Edwards, G.F., Girvan, E.K., Kearns, A.M., Pichon, B., Hill, R.L.R., Larsen, A.R., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, D.J., Holmes, M.A.**, 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
- García, M.S., De La Torre, M.Á., Morales, G., Peláez, B., Tolón, M.J., Domingo, S., Candel, F.J., Andrade, R., Arribi, A., García, N., Sagasti, F.M., Fereres, J., Picazo, J.**, 2010. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *JAMA* 303, 2260–2264. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.757>

- Garcillán-Barcia, M.P., Alvarado, A., De la Cruz, F.**, 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 936–956. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00291.x>
- Gary, J.M., Langohr, I.M., Lim, A., Bolin, S., Bolin, C., Moore, I., Kiupel, M.**, 2014. Enteric colonization by *Staphylococcus delphini* in four ferret kits with diarrhoea. *J. Comp. Pathol.* 151, 314–317. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.08.004>
- Gawryszewska, I., Żabicka, D., Hryniewicz, W., Sadowy, E.**, 2017. Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: species, clonality and determinants of linezolid resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 1279–1286. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2934-7>
- Gharsa, H., Ben Slama, K., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Klibi, N., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C.**, 2015. Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine Vet. J.* 47, 463–466. <https://doi.org/10.1111/evj.12305>
- Gibbs, S.G., Green, C.F., Tarwater, P.M., Mota, L.C., Mena, K.D., Scarpino, P. V.**, 2006. Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environ. Health Perspect.* 114, 1032–1037. <https://doi.org/10.1289/ehp.8910>
- Gijón, M., Bellusci, M., Petraitiene, B., Noguera-Julian, A., Zilinskaite, V., Sanchez Moreno, P., Saavedra-Lozano, J., Glikman, D., Daskalaki, M., Kaiser-Labusch, P., Falup-Pecurariu, O., Montagnani, C., Prieto, L., Gené, A., Trumpulyte, G., Kulecnikova, I., Lepe, J.A., Cercenado, E., Kudinsky, R., Makri, A., Huppertz, H.I., Bleotu, L., Cocchi, P., García-Hierro, P., Vitkauskiene, A., Fortuny, C., Zukovskaja, V., Neth, O., Santos, M., Rokney, A., Petra, M., Lixandru, R., Galli, L., Guillén, S., Chaves, F., Rojo Conejo, P.**, 2016. Factors associated with severity in invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children: a prospective European multicentre study. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 643.e1-643.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.004>
- Giormezis, N., Kolonitsiou, F., Foka, A., Drougka, E., Liakopoulos, A., Makri, A., Papanastasiou, A.D., Vogiatzi, A., Dimitriou, G., Marangos, M., Christofidou, M., Anastassiou, E.D., Petinaki, E., Spiliopoulou, I.**, 2014. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: The role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. *J. Med. Microbiol.* 63, 1500–1508. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.075259-0>
- Gladysheva, I.P., Turner, R.B., Sazonova, I.Y., Liu, L., Reed, G.L.**, 2003. Coevolutionary patterns in plasminogen activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9168–9172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1631716100>
- Goerke, C., Pantucek, R., Holtfreter, S., Schulte, B., Zink, M., Grumann, D., Bröker, B.M., Doskar, J., Wolz, C.**, 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.* 191, 3462–3468. <https://doi.org/10.1128/JB.01804-08>
- Gómez-Sanz, E., Kadlec, K., Feßler, A.T., Zarazaga, M., Torres, C., Schwarz, S.**, 2013a. A novel FexA variant from a canine *Staphylococcus pseudintermedius* isolate that does not confer florfenicol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5763–5766. <https://doi.org/10.1128/AAC.00948-13>

- Gómez-Sanz, E., Simón, C., Ortega, C., Gómez, P., Lozano, C., Zarazaga, M., Torres, C., 2014.** First detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 and *Staphylococcus pseudintermedius* ST68 from hospitalized equines in Spain. *Zoonoses Public Health* 61, 192–201. <https://doi.org/10.1111/zph.12059>
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Benito, D., Lozano, C., Zarazaga, M., 2013b.** Animal and human *Staphylococcus aureus* associated clonal lineages and high rate of *Staphylococcus pseudintermedius* novel lineages in Spanish kennel dogs: Predominance of *S. aureus* ST398. *Vet. Microbiol.* 166, 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.014>
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Ceballos, S., Lozano, C., Zarazaga, M., 2013c.** Clonal dynamics of nasal *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dog-owning household members. Detection of MSSA ST398. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069337>
- 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. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0610>
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Sáenz, Y., Zarazaga, M., 2011.** Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.08.002>
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Zarazaga, M., 2013d.** High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.10.001>
- Gómez, P., Casado, C., Sáenz, Y., Ruiz-Ripa, L., Estepa, V., Zarazaga, M., Torres, C., 2017.** Diversity of species and antimicrobial resistance determinants of staphylococci in superficial waters in Spain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw208>
- Gómez, P., González-Barrio, D., Benito, D., Garcíá, J.T., Viñuela, J., Zarazaga, M., Ruiz-Fons, F., Torres, C., 2014.** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2061–2064. <https://doi.org/10.1093/jac/dku100>
- Gómez, P., Lozano, C., Camacho, M.C., Lima-Barbero, J.F., Hernández, J.M., Zarazaga, M., Höfle, Ú., Torres, C., 2016.** Detection of MRSA ST3061-t843-*mecC* and ST398-t011-*mecA* in white stork nestlings exposed to human residues. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 53–57. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv314>
- Gómez, P., Lozano, C., González-Barrio, D., Zarazaga, M., Ruiz-Fons, F., Torres, C., 2015.** High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in a semi-extensive red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) farm in Southern Spain. *Vet. Microbiol.* 177, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.029>
- González-Domínguez, M.S., Carvajal, H.D., Calle-Echeverri, D.A., Chinchilla-Cárdenas, D., 2020.** Molecular detection and characterization of the *mecA* and *nuc* genes from *Staphylococcus* species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi*) isolated from dogs suffering superficial pyoderma

- and their antimicrobial resistance profiles. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00376>
- Gopal Rao, G., Batura, R., Nicholl, R., Coogan, F., Patel, B., Bassett, P., Kearns, A.M.**, 2019. Outbreak report of investigation and control of an outbreak of Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (PVL-MSSA) infection in neonates and mothers. *BMC Infect. Dis.* 19, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3802-0>
- Gortázar, C., Ruiz-Fons, J.F., Höfle, U.**, 2016. Infections shared with wildlife: an updated perspective. *Eur. J. Wildl. Res.* 62, 511–525. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1033-x>
- Grönthal, T., Eklund, M., Thomson, K., Piiparinen, H., Sironen, T., Rantala, M.**, 2017. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1021–1030. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw559>
- Grönthal, T., Moodley, A., Nykäsenoja, S., Junnila, J., Guardabassi, L., Thomson, K., Rantala, M.**, 2014. Large outbreak caused by methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a finnish veterinary teaching hospital - From outbreak control to outbreak prevention. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110084>
- Gu, B., Kelesidis, T., Tsiodras, S., Hindler, J., Humphries, R.M.**, 2013. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 4–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dks354>
- Guardabassi, L., Schmidt, K.R., Petersen, T.S., Espinosa-Gongora, C., Moodley, A., Agersø, Y., Olsen, J.E.**, 2012. Mustelidae are natural hosts of *Staphylococcus delphini* group A. *Vet. Microbiol.* 159, 351–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.004>
- Guerin, F., Sassi, M., Dejoies, L., Zouari, A., Schutz, S., Potrel, S., Auzou, M., Collet, A., Lecoite, D., Auger, G., Cattoir, V.**, 2020. Molecular and functional analysis of the novel *cfr*(D) linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 1699–1703. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa125>
- Guo, D., Liu, Y., Han, C., Chen, Z., Ye, X.**, 2018. Phenotypic and molecular characteristics of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolated from pigs: Implication for livestock-association markers and vaccine strategies. *Infect. Drug Resist.* 11, 1299–1307. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173624>
- Haag, A.F., Fitzgerald, J.R., Penadés, J.R.**, 2019. *Staphylococcus aureus* in animals. *Microbiol. Spectr.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0060-2019>
- Haenni, M., De Moraes, N.A., Châtre, P., Médaille, C., Moodley, A., Madec, J.Y.**, 2014. Characterisation of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.02.002>
- Haenni, M., Saras, E., Châtre, P., Médaille, C., Bes, M., Madec, J.Y., Laurent, F.**, 2012. A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains infecting cats and dogs in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 326–329. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr499>

- Halaji, M., Karimi, A., Shoaie, P., Nahaei, M., Khorvash, F., Ataei, B., Yaran, M., Havaei, S.A.**, 2017. Distribution of SCC_{mec} elements and presence of Panton-Valentine leukocidin in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in a University Hospital of Isfahan City, Iran. *J. Clin. Diagnostic Res.* 11, DC27–DC31. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25518.10258>
- Hao, H., Dai, M., Wang, Y., Huang, L., Yuan, Z.**, 2012. Key genetic elements and regulation systems in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 7, 1315–1329. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.107>
- Harmsen, D., Claus, Heike, Witte, W., Claus, Hermann, Turnwald, D., Vogel, U.**, 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital detting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *Society* 41, 5442–5448. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5442>
- Harrison, E.M., Paterson, G.K., Holden, M.T.G., Morgan, F.J.E., Larsen, A.R., Petersen, A., Leroy, S., De Vlieghe, S., Perreten, V., Fox, L.K., Lam, T.J.G.M., Sampimon, O.C., Zadoks, R.N., Peacock, S.J., Parkhill, J., Holmes, M.A.**, 2013. A *Staphylococcus xylosus* isolate with a new *mecC* allotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1524–1528. <https://doi.org/10.1128/AAC.01882-12>
- Hasman, H., Moodley, A., Guardabassi, L., Stegger, M., Skov, R.L., Aarestrup, F.M.**, 2010. *spa* type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet. Microbiol.* 141, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.025>
- He, T., Shen, Y., Schwarz, S., Cai, J., Lv, Y., Li, J., Feßler, A.T., Zhang, R., Wu, C., Shen, J., Wang, Y.**, 2016. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1466–1473. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw016>
- Heaton, C.J., Gerbig, G.R., Sensius, L.D., Patel, V., Smith, T.C.**, 2020. *Staphylococcus aureus* epidemiology in wildlife: A systematic review. *Antibiotics* 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020089>
- Heilmann, C., Ziebuhr, W., Becker, K.**, 2019. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 1071–1080. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.012>
- Hernando-Amado, S., Coque, T.M., Baquero, F., Martínez, J.L.**, 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* 4, 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Ho, P.L., Chow, K.H., Lai, E.L., Law, P.Y.T., Chan, P.Y., Ho, A.Y.M., Ng, T.K., Yam, W.C.**, 2012. Clonality and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* isolates from food animals and other animals. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3735–3737. <https://doi.org/10.1128/JCM.02053-12>
- Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., Embden, J.D.A. Van, Willems, R.J.L.**, 2002. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1963–1971. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1963>

- Hot, C., Berthet, N., Chesneau, O.**, 2014. Characterization of *sal(A)*, a novel gene responsible for lincosamide and streptogramin A resistance in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3335–3341. <https://doi.org/10.1128/AAC.02797-13>
- Hritcu, O.M., Schmidt, V.M., Salem, S.E., Maciuca, I.E., Moraru, R.F., Lipovan, I., Mareş, M., Solcan, G., Timofte, D.**, 2020. Geographical variations in virulence factors and antimicrobial resistance amongst staphylococci Isolated from dogs from the United Kingdom and Romania. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00414>
- Hsieh, S.E., Hsu, L.L., Hsu, W.H., Chen, C.Y., Chen, H.J., Liao, C.T.**, 2006. Importance of amino acid alterations and expression of penicillin-binding protein 5 to ampicillin resistance of *Enterococcus faecium* in Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents* 28, 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.07.027>
- Hua, R., Xia, Y., Wu, W., Yang, M., Yan, J.**, 2018. Molecular epidemiology and mechanisms of 43 low-level linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* strains in Chongqing, China. *Ann. Lab. Med.* 39, 36–42. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.1.36>
- Huang, J., Wang, M., Gao, Y., Chen, L., Wang, L.**, 2019. Emergence of plasmid-mediated oxazolidinone resistance gene *poxtA* from CC17 *Enterococcus faecium* of pig origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2524–2530. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz250>
- Hung, W.C., Chen, H.J., Lin, Y.T., Tsai, J.C., Chen, C.W., Lu, H.H., Tseng, S.P., Jheng, Y.Y., Leong, K.H., Teng, L.J.**, 2015. Skin commensal staphylococci may act as reservoir for fusidic acid resistance genes. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143106>
- Imanishi, I., Nicolas, A., Caetano, A.C.B., Castro, T.L. de P., Tartaglia, N.R., Mariutti, R., Guédon, E., Even, S., Berkova, N., Arni, R.K., Seyffert, N., Azevedo, V., Nishifuji, K., Le Loir, Y.**, 2019. Exfoliative toxin E, a new *Staphylococcus aureus* virulence factor with host-specific activity. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52777-3>
- Ingmer, H., Gerlach, D., Wolz, C.**, 2019. Temperate phages of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0058-2018>
- Ito, T., Hiramatsu, K., Oliveira, D.C., De Lencastre, H., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Giffard, P.M., Coleman, D., Tenover, F.C., Boyle-Vavra, S., Skov, R.L., Enright, M.C., Kreiswirth, B., Kwan, S.K., Grundmann, H., Laurent, F., Sollid, J.E., Kearns, A.M., Goering, R., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B.**, 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4961–4967. <https://doi.org/10.1128/AAC.00579-09>
- Iyori, K., Futagawa-Saito, K., Hisatsune, J., Yamamoto, M., Sekiguchi, M., Ide, K., Son, W.G., Olivry, T., Sugai, M., Fukuyasu, T., Iwasaki, T., Nishifuji, K.**, 2011. *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. *Vet. Dermatol.* 22, 319–326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00952.x>
- Iyori, K., Hisatsune, J., Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Ide, K., Nagata, M., Fukata, T., Iwasaki, T., Oshima, K., Hattori, M., Sugai, M., Nishifuji, K.**, 2010. Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines

- with pyoderma and healthy dogs. *FEMS Microbiol. Lett.* 312, 169–175. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02113.x>
- 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. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631>
- Jevons, M.P.,** 1961. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1, 124–125. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5219.124-a>
- Jiang, B., Wang, Y., Feng, Z., Xu, L., Tan, L., Zhao, S., Gong, Y., Zhang, C., Luo, X., Li, S., Rao, X., Peng, Y., Xie, Z., Hu, X.,** 2017. Panton-Valentine leucocidin (PVL) as a potential indicator for prevalence, duration, and severity of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Front. Microbiol.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02355>
- Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M., Aarestrup, F.M.,** 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>
- Jung, P., Abdelbary, M.M.H., Kraushaar, B., Fetsch, A., Geisel, J., Herrmann, M., Witte, W., Cuny, C., Bischoff, M.,** 2017. Impact of bacteriophage Saint3 carriage on the immune evasion capacity and hemolytic potential of *Staphylococcus aureus* CC398. *Vet. Microbiol.* 200, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.015>
- Junie, L.M., Jeican, I.I., Matroș, L., Pandrea, S.L.,** 2018. Molecular epidemiology of the community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones: A synthetic review. *Clujul Med.* 91, 7–11. <https://doi.org/10.15386/cjmed-807>
- Jureen, R., Top, J., Mohn, S.C., Harthug, S., Langeland, N., Willems, R.J.L.,** 2003. Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2330–2336. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2330-2336.2003>
- Kaas, R.S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Lund, O.,** 2014. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>
- Kadlec, K., Schwarz, S.,** 2010. Identification of the novel *dfcK*-carrying transposon Tn559 in a porcine methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3475–3477. <https://doi.org/10.1128/AAC.00464-10>
- Kadlec, K., Schwarz, S.,** 2009. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfcK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 776–778. <https://doi.org/10.1128/AAC.01128-08>
- Kaneko, J., Kamio, Y.,** 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 981–1003. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.981>

- Käppeli, N., Morach, M., Corti, S., Eicher, C., Stephan, R., Johler, S.,** 2019. *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. *J. Dairy Sci.* 102, 3274–3281. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15317>
- Kaspar, U., Kriegeskorte, A., Schubert, T., Peters, G., Rudack, C., Pieper, D.H., Wos-Oxley, M., Becker, K.,** 2016. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ. Microbiol.* 18, 2130–2142. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12891>
- Kaspar, U., von Lützau, A., Schlattmann, A., Roesler, U., Köck, R., Becker, K.,** 2018. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. *PLoS One* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208364>
- Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T., Fukata, T.,** 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 1615–1619. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0172>
- Kehrenberg, C., Aarestrup, F.M., Schwarz, S.,** 2007. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cf.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 483–487. <https://doi.org/10.1128/AAC.01340-06>
- Kehrenberg, C., Cuny, C., Strommenger, B., Schwarz, S., Witte, W.,** 2009. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cf.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 779–781. <https://doi.org/10.1128/AAC.01376-08>
- Kehrenberg, C., Schwarz, S.,** 2006. Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cf.* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1156–1163. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1156-1163.2006>
- Kehrenberg, C., Schwarz, S.,** 2005. Florfenicol-chloramphenicol exporter gene *fexA* is part of the novel transposon Tn558. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 813–815. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.813-815.2005>
- Kerschner, H., Harrison, E.M., Hartl, R., Holmes, M.A., Apfalter, P.,** 2015. First report of *mecC* MRSA in human samples from Austria: Molecular characteristics and clinical data. *New Microbes New Infect.* 3, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.11.001>
- Khan, A., Wilson, B., Gould, I.M.,** 2018. Current and future treatment options for community-associated MRSA infection. *Expert Opin. Pharmacother.* 19, 457–470. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1442826>
- Kittl, S., Brodard, I., Heim, D., Andina-pfister, P., Overesch, G.,** 2020. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains in swiss pigs and their relation to isolates from farmers and veterinarians. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.01865-19>
- Kizerwetter-Swida, M., Chrobak-Chmiel, D., Rzewuska, M., Antosiewicz, A., Dolka, B., Ledwoń, A., Czujkowska, A., Binek, M.,** 2015. Genetic characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from healthy pigeons. *Pol. J. Vet. Sci.* 18, 627–634. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0081>

- Klibi, A., Maaroufi, A., Torres, C., Jouini, A.**, 2018. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 930–935. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.026>
- Köck, R., Schaumburg, F., Mellmann, A., Köksal, M., Jurke, A., Becker, K., Friedrich, A.W.**, 2013. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055040>
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J., Hiramatsu, K.**, 2007. 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.* 51, 264–274. <https://doi.org/10.1128/AAC.00165-06>
- Koop, G., Vrieling, M., Storisteanu, D.M.L., Lok, L.S.C., Monie, T., Van Wigcheren, G., Raisen, C., Ba, X., Gleadall, N., Hadjirin, N., Timmerman, A.J., Wagenaar, J.A., Klunder, H.M., Fitzgerald, J.R., Zadoks, R., Paterson, G.K., Torres, C., Waller, A.S., Loeffler, A., Loncaric, I., Hoet, A.E., Bergström, K., De Martino, L., Pomba, C., De Lencastre, H., Ben Slama, K., Gharsa, H., Richardson, E.J., Chilvers, E.R., De Haas, C., Van Kessel, K., Van Strijp, J.A.G., Harrison, E.M., Holmes, M.A.**, 2017. Identification of LukPQ, a novel, equid-adapted leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep40660>
- Kord, M., Ardebili, A., Jamal, M., Jahanbakhsh, R., Behnampour, N., Ghaemi, E.A.**, 2018. Evaluation of biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* 9, 160–166. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.4.04>
- Kraushaar, B., Hammerl, J.A., Kienöl, M., Heinig, M.L., Sperling, N., Thanh, M.Di., Reetz, J., Jäckel, C., Fetsch, A., Hertwig, S.**, 2017. Acquisition of virulence factors in livestock-associated MRSA: Lysogenic conversion of CC398 strains by virulence gene-containing phages. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02175-4>
- Kulangara, V., Nair, N., Sivasailam, A., Sasidharan, S., Kollannur, J.D., Syam, R.**, 2017. Genotypic and phenotypic β -lactam resistance and presence of PVL gene in staphylococci from dry bovine udder. *PLoS One* 12, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187277>
- Kurli, R., Chaudhari, D., Pansare, A.N., Khairnar, M., Shouche, Y.S., Rahi, P.**, 2018. Cultivable microbial diversity associated with cellular phones. *Front. Microbiol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01229>
- Kuroda, M., Sekizuka, T., Matsui, H., Suzuki, K., Seki, H., Saito, L., Hanaki, H.**, 2018. Complete genome sequence and characterization of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate KUB3006 carrying a *cfr*(B)-transposon on its chromosome and *optrA*-plasmid. *Front. Microbiol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02576>
- Lakhundi, S., Zhang, K.**, 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–103. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Lappin, E., Ferguson, A.J.**, 2009. Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 9, 281–290. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70066-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70066-0)

- Larsen, J., Clasen, J., Hansen, J.E., Paulander, W., Petersen, A., Larsen, A.R., Frees, D., 2016a.** Copresence of *tet(K)* and *tet(M)* in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 is associated with increased fitness during exposure to sublethal concentrations of tetracycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4401–4403. <https://doi.org/10.1128/AAC.00426-16>
- Larsen, J., Stegger, M., Andersen, P.S., Petersen, A., Larsen, A.R., Westh, H., Agersø, Y., Fetsch, A., Kraushaar, B., Käsbohrer, A., Feßler, A.T., Schwarz, S., Cuny, C., Witte, W., Butaye, P., Denis, O., Haenni, M., Madec, J.Y., Jouy, E., Laurent, F., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Mammina, C., Pantosti, A., Monaco, M., Wagenaar, J.A., De Boer, E., Van Duijkeren, E., Heck, M., Domínguez, L., Torres, C., Zarazaga, M., Price, L.B., Skov, R.L., 2016b.** Evidence for human adaptation and foodborne transmission of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1349–1352. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw532>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2012.** Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lautz, S., Kanbar, T., Alber, J., Lämmler, C., Weiss, R., Prenger-Berninghoff, E., Zschöck, M., 2006.** Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 434–438. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00999.x>
- Laux, C., Peschel, A., Krismer, B., 2019.** *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. *Gram-Positive Pathog.* 723–730. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch45>
- Leavis, H.L., Willems, R.J.L., Top, J., Bonten, M.J.M., 2006.** High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1059–1064. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1059-1064.2006>
- Lee, A.S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S., 2018.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Lee, S.M., Huh, H.J., Song, D.J., Shim, H.J., Park, K.S., Kang, C.I., Ki, C.S., Lee, N.Y., 2017.** Resistance mechanisms of linezolid-nonsusceptible enterococci in Korea: Low rate of 23s rRNA mutations in *Enterococcus faecium*. *J. Med. Microbiol.* 66, 1730–1735. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000637>
- Lee, T., Pang, S., Abraham, S., Coombs, G.W., 2019.** Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.016>
- Lei, C.W., Kang, Z.Z., Wu, S.K., Chen, Y.P., Kong, L.H., Wang, H.N., 2019.** Detection of the phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene *poxtA* in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* of food-producing animal origin in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2459–2461. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz198>

- Lekkerkerk, W.S.N., Van Wamel, W.J.B., Snijders, S. V., Willems, R.J., Van Duijkeren, E., Broens, E.M., Wagenaar, J.A., Lindsay, J.A., Vos, M.C.,** 2015. What is the origin of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 isolates from humans without livestock contact? An epidemiological and genetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1836–1841. <https://doi.org/10.1128/JCM.02702-14>
- Li, D., Wang, Y., Schwarz, S., Cai, J., Fan, R., Li, J., Feßler, A.T., Zhang, R., Wu, C., Shen, J.,** 2016. Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1474–1478. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw040>
- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J.,** 1999a. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128–1132. <https://doi.org/10.1086/313461>
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J.,** 1999b. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1062–1066. <https://doi.org/10.1128/aac.43.5.1062>
- Lindgren, A.K., Gustafsson, E., Petersson, A.C., Melander, E.,** 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with *mecC*: a description of 45 human cases in southern Sweden. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 971–975. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2624-x>
- Liu, B., Lei, C., Zhang, A., Pan, Y., Kong, L.-H., Xiang, R., Wang, Y.-X., Yang, Y.-X., Wang, H.-N.,** 2017. Colocation of the multiresistance gene *cfr* and the fosfomycin resistance gene *fosD* on a novel plasmid in *Staphylococcus arlettae* from a chicken farm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 1–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-17>
- Liu, H., Wang, Y., Wu, C., Schwarz, S., Shen, Z., Jeon, B., Ding, S., Zhang, Q., Shen, J.,** 2012. A novel phenicol exporter gene, *fexB*, found in enterococci of animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 322–325. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr481>
- Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Shen, Z., Schwarz, S., Du, X.D., Dai, L., Zhang, W., Zhang, Q., Shen, J.,** 2012. First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1650–1654. <https://doi.org/10.1128/AAC.06091-11>
- Lo, Y.P., Wan, M.T., Chen, M.M., Su, H.Y., Lauderdale, T.L., Chou, C.C.,** 2012. Molecular characterization and clonal genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of pig origin in Taiwan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.05.001>
- Locke, J.B., Zurenko, G.E., Shaw, K.J., Bartizal, K.,** 2014. Tedizolid for the management of human infections: In vitro characteristics. *Clin. Infect. Dis.* 58, 35–42. <https://doi.org/10.1093/cid/cit616>
- Loeffler, A., Pfeiffer, D.U., Lindsay, J.A., Magalhães, R.J.S., Lloyd, D.H.,** 2011. Prevalence of and risk factors for MRSA carriage in companion animals: A survey of dogs, cats and horses. *Epidemiol. Infect.* 139, 1019–1028. <https://doi.org/10.1017/S095026881000227X>

- Loncaric, I., Küber-heiss, A., Posautz, A., Ruppitsch, W., Lepuschitz, S., Schauer, B., Feßler, A.T., Krametter-frötscher, R., Harrison, E.M., Holmes, M.A., Künzel, F., Szostak, M.P., Hauschild, T., Desvars-larrive, A., Misic, D., Rosengarten, R., Walzer, C., Slickers, P., Monecke, S., Ehricht, R., Schwarz, S., Spergser, J., 2019a. Characterization of *mecC* gene-carrying coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from various animals. *Vet. Microbiol.* 230, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.014>
- Loncaric, I., Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Trstan, A., Andreadis, T., Bouchlis, N., Marbach, H., Schauer, B., Szostak, M.P., Feßler, A.T., Künzel, F., Licka, T., Springer, B., Allerberger, F., Monecke, S., Ehricht, R., Schwarz, S., Spergser, J., 2019b. Increased genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from companion animals. *Vet. Microbiol.* 235, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.013>
- Loncaric, I., Tichy, A., Handler, S., Szostak, M.P., Tickert, M., Diab-Elschahawi, M., Spergser, J., Künzel, F., 2019c. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* sp. (MRS) in different companion animals and determination of risk factors for colonization with MRS. *Antibiotics* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020036>
- López-Fabal, F., Román Alonso, F., Almagro Moltó, M., Sanz Rodríguez, N., Gómez-Garcés, J.L., 2013. *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes al linezolid: características fenotípicas, genotípicas y sensibilidad a combinaciones de antibióticos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.10.011>
- López, M., Kadlec, K., Schwarz, S., Torres, C., 2012. First detection of the staphylococcal trimethoprim resistance gene *dfiK* and the *dfiK*-carrying transposon Tn559 in enterococci. *Microb. Drug Resist.* 18, 13–18. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0073>
- Lozano, C., Aspiroz, C., Gómez-Sanz, E., Tirado, G., Fortuño, B., Zarazaga, M., Torres, C., 2013. Caracterización de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. haemolyticus* resistentes a meticilina y linezolid en un hospital español. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.08.006>
- Lozano, C., Aspiroz, C., Rezusta, A., Gómez-Sanz, E., Simon, C., Gómez, P., Ortega, C., Revillo, M.J., Zarazaga, M., Torres, C., 2012a. 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. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.009>
- Lozano, C., Aspiroz, C., Sáenz, Y., Ruiz-García, M., Royo-García, G., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2012b. Genetic environment and location of the *Inu(A)* and *Inu(B)* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2804–2808. <https://doi.org/10.1093/jac/dks320>
- Lozano, C., Rezusta, A., Ferrer, I., Pérez-Laguna, V., Zarazaga, M., Ruiz-Ripa, L., Revillo, M.J., Torres, C., 2017. *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: Dog-to-human transmission. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 17, 268–270. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2048>
- Lozano, C., Rezusta, A., Gómez, P., Gómez-Sanz, E., Báez, N., Martín-Saco, G., Zarazaga, M., Torres, C., 2012c. 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. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr497>
- Lozano, C., Ruiz-García, M., Gómez-Sanz, E., López-García, P., Royo-García, G., Zarazaga, M., Torres, C.,** 2012d. Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73, 380–382. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.013>
- MacFadyen, A.C., Harrison, E.M., Drigo, I., Parkhill, J., Holmes, M.A., Paterson, G.K.,** 2019. A *mecC* allotype, *mecC3*, in the CoNS *Staphylococcus caeli*, encoded within a variant SCC*mecC*. J. Antimicrob. Chemother. 74, 547–552. <https://doi.org/10.1093/jac/dky502>
- Magleby, R., Bemis, D.A., Kim, D., Carroll, K.C., Castanheira, M., Kania, S.A., Jenkins, S.G., Westblade, L.F.,** 2019. First reported human isolation of *Staphylococcus delphini*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 94, 274–276. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.014>
- Malachowa, N., Deleo, F.R.,** 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. 67, 3057–3071. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0389-4>
- Mališová, L., Jakubů, V., Musílek, M., Kekláková, J., Žemličková, H.,** 2020. Phenotype and genotype characteristics of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin/oxacillin carrying gene *mecC* in the Czech Republic from 2002 to 2017. Microb. Drug Resist. 26, 918–923. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0319>
- Małyśzko, I., Schwarz, S., Hauschild, T.,** 2014. Detection of a new *mecC* allotype, *mecC2*, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. J. Antimicrob. Chemother. 69, 2003–2005. <https://doi.org/10.1093/jac/dku043>
- Mama, O.M., Morales, L., Ruiz-Ripa, L., Zarazaga, M., Torres, C.,** 2020. High prevalence of multidrug resistant *S. aureus*-CC398 and frequent detection of enterotoxin genes among non-CC398 *S. aureus* from pig-derived food in Spain. Int. J. Food Microbiol. 320, 108510. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108510>
- Mama, O.M., Paula, G., Ruiz-Ripa, L., Elena, G., Zarazaga, M., Torres, C.,** 2019a. Antimicrobial resistance, virulence, and genetic lineages of staphylococci from horses destined for human consumption: High detection of *S. aureus* Isolates of lineage ST1640 and those carrying the *lukPQ* gene. Anim. 9, 900. <https://doi.org/10.3390/ani9110900>
- Mama, O.M., Ruiz-Ripa, L., Fernández-Fernández, R., González-Barrio, D., Ruiz-Fons, J.F., Torres, C.,** 2019b. High frequency of coagulase-positive staphylococci carriage in healthy wild boar with detection of MRSA of lineage ST398-t011. FEMS Microbiol. Lett. 366. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny292>
- Mama, O.M., Ruiz-Ripa, L., Lozano, C., González-Barrio, D., Ruiz-Fons, J.F., Torres, C.,** 2019c. High diversity of coagulase negative staphylococci species in wild boars, with low antimicrobial resistance rates but detection of relevant resistance genes. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 64, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.03.006>

- Manian, F.A.**, 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. Clin. Infect. Dis. 36. <https://doi.org/10.1086/344772>
- Martínez-Meléndez, A., Morfín-Otero, R., Villarreal-Treviño, L., González-González, G., Llaca-Díaz, J., Rodríguez-Noriega, E., Camacho-Ortíz, A., Garza-González, E.**, 2015. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) in coagulase negative staphylococci. Med. Univ. 17, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.10.003>
- Martins, K.B., Faccioli, P.Y., Bonesso, M.F., Fernandes, S., Oliveira, A.A., Dantas, A., Zafalon, L.F., Cunha, M. de L.R.S.**, 2017. Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 100, 2184–2195. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11583>
- Martins, P.D., De Almeida, T.T., Basso, A.P., De Moura, T.M., Frazzon, J., Tondo, E.C., Frazzon, A.P.G.**, 2013. Coagulase-positive staphylococci isolated from chicken meat: Pathogenic potential and vancomycin resistance. Foodborne Pathog. Dis. 10, 771–776. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1492>
- Mcewen, S.A., Collignon, P.J.**, 2017. Antimicrobial resistance: A One Health colloquium. Microbiol. Spectr. 6, 1–26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>.
- Mclaws, F., Chopra, I., O'Neill, A.J.**, 2008. High prevalence of resistance to fusidic acid in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemother. 61, 1040–1043. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn071>
- Meka, V.G., Gold, H.S., Cooke, A., Venkataraman, L., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Jenkins, S.G.**, 2004. Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 54, 818–820. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh423>
- Mendes, R.E., Deshpande, L., Streit, J.M., Sader, H.S., Castanheira, M., Hogan, P.A., Flamm, R.K.**, 2018. ZAAPS programme results for 2016: An activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1880–1887. <https://doi.org/10.1093/jac/dky099>
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Farrell, D.J., Spanu, T., Fadda, G., Jones, R.N.**, 2010. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. J. Antimicrob. Chemother. 65, 2329–2335. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq331>
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Jones, R.N.**, 2014. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. Drug Resist. Updat. 17, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.04.002>
- Mendes, R.E., Hogan, P.A., Jones, R.N., Sader, H.S., Flamm, R.K.**, 2016. Surveillance for linezolid resistance via the Zyvox[®] Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) programme (2014): Evolving resistance mechanisms with stable susceptibility rates. J. Antimicrob. Chemother. 71, 1860–1865. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw052>
- Mendes, R.E., Paukner, S., Doyle, T.B., Gelone, S.P., Flamm, R.K., Sader, H.S.**, 2019. Low prevalence of Gram-positive isolates showing elevated lefamulin MIC results during the SENTRY surveillance

- program for 2015–2016 and characterization of resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.02158-18>
- Miller, K., Dunsmore, C.J., Fishwick, C.W.G., Chopra, I.**, 2008. Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1737–1742. <https://doi.org/10.1128/AAC.01015-07>
- Miller, W.R., Munita, J.M., Arias, C.A.**, 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 1221–1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
- Missiakas, D.M., Schneewind, O.**, 2018. Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Mittal, G., Bhandari, V., Gaiind, R., Rani, V., Chopra, S., Dawar, R., Sardana, R., Verma, P.K.**, 2019. Linezolid resistant coagulase negative staphylococci (LRCoNS) with novel mutations causing blood stream infections (BSI) in India. *BMC Infect. Dis.* 19, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4368-6>
- Monecke, S., Gavier-Widén, D., Hotzel, H., Peters, M., Guenther, S., Lazaris, A., Loncaric, I., Müller, E., Reissig, A., Ruppelt-Lorz, A., Shore, A.C., Walter, B., Coleman, D.C., Ehricht, R.**, 2016. Diversity of *Staphylococcus aureus* isolates in european wildlife. *PLoS One* 11, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168433>
- Monecke, S., Gavier-Widen, D., Mattsson, R., Rangstrup-Christensen, L., Lazaris, A., Coleman, D.C., Shore, A.C., Ehricht, R.**, 2013. Detection of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in diseased European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. *PLoS One* 8, 4–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066166>
- Morales, G., Picazo, J.J., Baos, E., Candel, F.J., Arribi, A., Peláez, B., Andrade, R., De La Torre, M.Á., Fereres, J., Sánchez-García, M.**, 2010. Resistance to linezolid is mediated by the *cfp* gene in the first report of an outbreak of linezolid resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 50, 821–825. <https://doi.org/10.1086/650574>
- Moreno-Grúa, E., Pérez-Fuentes, S., Viana, D., Cardells, J., Lizana, V., Aguiló, J., Selva, L., Corpa, J.M.**, 2020. Marked presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in wild lagomorphs in Valencia, Spain. *Animals* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ani10071109>
- Moure, Z., Lara, N., Marín, M., Sola-Campoy, P.J., Bautista, V., Gómez-Bertomeu, F., Gómez-Dominguez, C., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Campos, J., Cercenado, E., Oteo-Iglesias, J.**, 2020. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxtA* genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105977>
- Mundbjerg, K., Pedersen, P.E., Sebbelov, I., Honoré, O.L., Aalbæk, B., Larsen, C., Moore, A.E., Hammer, A.S.**, 2020. Urolithiasis and cystitis associated with *Staphylococcus delphini* group A and mortality in post-weaning mink kits (*Neovison vison*). *Vet. Microbiol.* 245, 108706. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108706>
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-varkila, J., Solh, E., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., Vindel, A., Laconcha,**

- I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-liljequist, B., Ransjo, 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1574>
- Murray, A.K., Lee, J., Bendall, R., Zhang, L., Sunde, M., Slettemeås, J.S., Gaze, W., Page, A.J., Vos, M., 2018. *Staphylococcus cornubiensis* sp. nov., a member of the *Staphylococcus intermedius* group (SIG). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 3404–3408. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002992>
- Murugaiyan, J., Walther, B., Stamm, I., Abou-Elnaga, Y., Brueggemann-Schwarze, S., Vincze, S., Wieler, L.H., Lübke-Becker, A., Semmler, T., Roesler, U., 2014. Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 1007–1015. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12662>
- Musumeci, R., Calaresu, E., Gerosa, J., Oggioni, D., Bramati, S., Morelli, P., Mura, I., Piana, A., Are, B.M., Cocuzza, C.E., 2016. Resistance to linezolid in *Staphylococcus* spp. clinical isolates associated with ribosomal binding site modifications: Novel mutation in domain v of 23S rRNA. *New Microbiol.* 39, 269–273.
- Nemeghaire, S., Vanderhaeghen, W., Angeles Argudín, M., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2014. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2928–2934. <https://doi.org/10.1093/jac/dku268>
- Nguyen, L.T.T., Román, F., Morikawa, K., Trincado, P., Marcos, C., Rojo-Martín, M.D., Cafini, F., 2018. Prevalence of pSCFS7-like vectors among *cfr*-positive staphylococcal population in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 305–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.004>
- Nikolaisen, N.K., Lassen, D.C.K., Chriél, M., Larsen, G., Jensen, V.F., Pedersen, K., 2017. Antimicrobial resistance among pathogenic bacteria from mink (*Neovison vison*) in Denmark. *Acta Vet. Scand.* 59, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0328-6>
- Novick, R.P., Ram, G., 2017. Staphylococcal pathogenicity islands — movers and shakers in the genomic firmament. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.08.001>
- Nowakiewicz, A., Ziółkowska, G., Zieba, P., Gnat, S., Wojtanowicz-Markiewicz, K., Trościańczyk, A., 2016. Coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from wildlife: Identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.11.003>
- O'Neill, A.J., McLaws, F., Kahlmeter, G., Henriksen, A.S., Chopra, I., 2007. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1737–1740. <https://doi.org/10.1128/AAC.01542-06>
- O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally. *Rev. Antimicrob. Resist.* 7, 110. <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- OIE, World Organisation for Animal Health, 2017. Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals. Better understanding of the global situation.

- Oliveira, D., Borges, A., Simões, M.,** 2018. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- OMS, Organización Mundial de la Salud,** 2017. Plan De Acción Mundial Sobre La Resistencia a Los Antimicrobianos. WHO Document Production Services. Geneva, Switzerland.
- Pang, S., Boan, P., Lee, T., Gangatharan, S., Tan, S.J., Daley, D., Lee, Y.T., Coombs, G.W.,** 2020. Linezolid-resistant ST872 *Enterococcus faecium* harbouring *optrA* and *cfr(D)* oxazolidinone resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 105831. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.012>
- Papagiannitsis, C.C., Tsilipounidaki, K., Malli, E., Petinaki, E.,** 2019. Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxtA*. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 2461–2462. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz155>
- Paridaens, H., Coussement, J., Argudín, M.A., Delaere, B., Huang, T.D., Glupczynski, Y., Denis, O.,** 2017. Clinical case of *cfr*-positive MRSA CC398 in Belgium. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 1527–1529. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2953-4>
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O.,** 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–61. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Paterson, G.K., Harrison, E.M., Holmes, M.A.,** 2014. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>
- Peeters, L.E.J., Argudín, M.A., Azadikhah, S., Butaye, P.,** 2015. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus aureus* recovered from pigs farms. *Vet. Microbiol.* 180, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.018>
- Pérez-Moreno, M.O., Centelles-Serrano, M.J., Nogales-López, J., Domenech-Spanedda, M.F., Lozano, C., Torres, C.,** 2017. Unusual presence of the immune evasion gene cluster in livestock-associated MRSA of lineage CC398 causing peridural and psoas abscesses in a poultry farmer. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 35, 651–654. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.07.008>
- Perreten, V., Chanchaithong, P., Prapasarakul, N., Rossano, A., Blum, S.E., Elad, D., Schwendener, S.,** 2013. Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome *mec* element (Ψ SCC*mec*57395) in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5509–5515. <https://doi.org/10.1128/AAC.00738-13>
- Perreten, V., Kania, S.A., Bemis, D.,** 2020. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the *Staphylococcus intermedius* group isolated from healthy black bears. *Int. J. Syst. Microbiol.* 70, 1–9. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004324>
- Petinaki, E., Spiliopoulou, I.,** 2015. Colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. *Vet. Med.* 6, 373–382. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S91313>
- Pfaller, M.A., Mendes, R.E., Streit, J.M., Hogan, P.A., Flamm, R.K.,** 2017. Five-year summary of in vitro activity and resistance mechanisms of linezolid against clinically important gram-positive cocci in the United States from the LEADER surveillance program (2011 to 2015). *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00609-17>

- Pires Dos Santos, T., Damborg, P., Moodley, A., Guardabassi, L.**, 2016. Systematic review on global epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of population structure from multilocus sequence typing data. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01599>
- Porrero, M.C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Casas-Díaz, E., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Fernández-Garayzábal, J.F., Domínguez, L.**, 2014. Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4865–4870. <https://doi.org/10.1128/AEM.00647-14>
- Porrero, M.C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Gómez-Barrero, S., Navarro-Gonzalez, N., Serrano, E., Casas-Díaz, E., Marco, I., Fernández-Garayzabal, J.F., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Domínguez, L.**, 2013. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage in different free-living wild animal species in Spain. *Vet. J.* 198, 127–130. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.004>
- Postma, B., Poppelier, M.J., van Galen, J.C., Prossnitz, E.R., van Strijp, J.A.G., de Haas, C.J.C., van Kessel, K.P.M.**, 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* 172, 6994–7001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6994>
- Poulsen, A.B., Skov, R., Pallesen, L. V.**, 2003. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 419–421. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg084>
- Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, S., Pearson, T., Laurent, F., Keim, P., Skov, R., Aarestrup, F.M.**, 2012. *Staphylococcus aureus* CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.00305-11>.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P.**, 2010. FastTree 2—Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Pyörälä, S., Taponen, S.**, 2009. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>
- Pyzik, E., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Urban-Chmiel, R., Jarosz, L.S., Jagiełło-Podębska, I.**, 2019. Detection of antibiotic resistance and classical enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from poultry in Poland. *J. Vet. Res.* 63, 183–190. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0023>
- Rahimpour, R., Mitchell, G., Khandaker, M.H., Kong, C., Singh, B., Xu, L., Ochi, A., Feldman, R.D., Pickering, J.G., Gill, B.M., Kelvin, D.J.**, 1999. Bacterial superantigens induce down-modulation of CC chemokine responsiveness in human monocytes via an alternative chemokine ligand-independent mechanism. *J. Immunol.* 162, 2299–2307.
- Reynaga, E., Torres, C., Garcia-Nuñez, M., Navarro, M., Vilamala, A., Puigoriol, E., Lucchetti, G.E., Sabrià, M.**, 2017. Clinical impact and prevalence of MRSA CC398 and differences between MRSA-Tet^R and MRSA-Tet^S in an area of Spain with a high density of pig farming: a prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 678.e1-678.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.019>

- Rodríguez-Lucas, C., Rodicio, M.R., Càmara, J., Domínguez, M., Alaguero, M., Fernández, J., 2020.** Long-term endemic situation caused by a linezolid- and meticillin-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital. *J. Hosp. Infect.* 105, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.013>
- Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J.B., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., 2005.** Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* 6, 920–927. <https://doi.org/10.1038/ni1235>
- Ross Fitzgerald, J., 2009.** The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: Species reclassification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Vet. Dermatol.* 20, 490–495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00828.x>
- Rubin, J.E., Chirino-Trejo, M., 2011.** Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 23, 351–354. <https://doi.org/10.1177/104063871102300227>
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M.J.M., Robinson, D.A., Top, J., Nallapareddy, S.R., Torres, C., Coque, T.M., Cantón, R., Baquero, F., Murray, B.E., Del Campo, R., Willems, R.J.L., 2006.** Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2220–2228. <https://doi.org/10.1128/JCM.02596-05>
- Ruiz-Ripa, L., Alcalá, L., Simón, C., Gómez, P., Mama, O.M., Rezusta, A., Zarazaga, M., Torres, C., 2019.** Diversity of *Staphylococcus aureus* clones in wild mammals in Aragon, Spain, with detection of MRSA ST130-*mecC* in wild rabbits. *J. Appl. Microbiol.* 127, 284–291. <https://doi.org/10.1111/jam.14301>
- Ruzauskas, M., Couto, N., Pavilionis, A., Klimiene, I., Siugzdiniene, R., Virgailis, M., Vaskeviciute, L., Anskiene, L., Pomba, C., 2016.** Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania. *Pol. J. Vet. Sci.* 19, 7–14. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0002>
- Saber, H., Jasni, A.S., Jamaluddin, T.Z.M.T., Ibrahim, R., 2017.** A review of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types in coagulase-negative staphylococci (CoNS) species. *Malaysian J. Med. Sci.* 24, 7–18. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.2>
- Sánchez-Gómez, J.C., Fraile-Malmierca, E., Valverde-Romero, E.D., Sánchez, M., García-Rodríguez, J.A., García-Sánchez, J.E., 2006.** Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*: First report in Spain. *J. Chemother.* 18, 440–442. <https://doi.org/10.1179/joc.2006.18.4.440>
- Santos, V., Gomes, A., Ruiz-Ripa, L., Mama, O.M., Sabença, C., Sousa, M., Silva, V., Sousa, T., Vieira-Pinto, M., Igrejas, G., Torres, C., Poeta, P.A.C.Q.D., 2020.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in purulent lesions of piglets and fattening pigs in Portugal. *Microb. Drug Resist.* 26, 850–856. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0219>
- Sanz, S., Olarte, C., Alonso, C.A., Hidalgo-Sanz, R., Gómez, P., Ruiz-Ripa, L., Torres, C., 2018.** Identification of enterococci, staphylococci, and enterobacteriaceae from slurries and air in and around two pork farms. *J. Food Prot.* 81, 1776–1782. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-098>

- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., Hiramatsu, K.**, 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2770–2778. <https://doi.org/10.1128/JCM.00360-07>
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirota, S., Kawakami, T., Fukata, T., Hiramatsu, K.**, 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 48, 765–769. <https://doi.org/10.1128/JCM.01232-09>
- Sassi, M., Guérin, F., Zouari, A., Beyrouthy, R., Auzou, M., Fines-Guyon, M., Potrel, S., Dejoies, L., Collet, A., Boukthir, S., Auger, G., Bonnet, R., Cattoir, V.**, 2019. Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in enterococci from France, 2006–16. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1469–1472. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz097>
- Schmitz, F.J.**, 1998. 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.* 41, 481–484. <https://doi.org/10.1093/jac/41.4.481>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.00868-06>
- Schoenfelder, S.M.K., Dong, Y., Feßler, A.T., Schwarz, S., Schoen, C., Köck, R., Ziebuhr, W.**, 2017. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Vet. Microbiol.* 200, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.019>
- Schwarz, S., Feßler, A.T., Loncaric, I., Wu, C., Kadlec, K., Wang, Y., Shen, J.**, 2018. Antimicrobial resistance among staphylococci of animal origin. *Microbiol. Spectr.* 6, 1–29. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0010-2017>
- Schwarz, S., Shen, J., Wendlandt, S., Feßler, A.T., Wang, Y., Kadlec, K., Wu, C.-M.**, 2014. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in staphylococci and other firmicutes. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0020-2014>
- Schwarz, S., Werckenthin, C., Kehrenberg, C.**, 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2530–2533. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2530-2533.2000>
- Schwendener, S., Perreten, V.**, 2012. New MLS B resistance gene *erm(43)* in *Staphylococcus lentus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4746–4752. <https://doi.org/10.1128/AAC.00627-12>
- Seral, C., Sáenz, Y., Algarate, S., Duran, E., Luque, P., Torres, C., Castillo, F.J.**, 2011. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 354–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.11.001>
- Shallcross, L.J., Fragaszy, E., Johnson, A.M., Hayward, A.C.**, 2013. The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 13, 43–54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4)

- Shariati, A., Dadashi, M., Chegini, Z., Van Belkum, A., Mirzaii, M., Khoramrooz, S.S., Darban-Sarokhalil, D.,** 2020. The global prevalence of daptomycin, tigecycline, quinupristin/dalfopristin, and linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci strains: A systematic review and meta-analysis. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 9, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00714-9>
- Shen, J., Wang, Y., Schwarz, S.,** 2013. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfrr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1697–1706. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt092>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.456>
- Shore, A.C., Brennan, O.M., Ehricht, R., Monecke, S., Schwarz, S., Slickers, P., Coleman, D.C.,** 2010. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfrr* in a Pantone-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4978–4984. <https://doi.org/10.1128/AAC.01113-10>
- Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., Coleman, D.C.,** 2011a. 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.* 55, 3765–3773. <https://doi.org/10.1128/AAC.00187-11>
- Shore, A.C., Rossney, A.S., Brennan, O.M., Kinnevey, P.M., Humphreys, H., Sullivan, D.J., Goering, R. V., Ehricht, R., Monecke, S., Coleman, D.C.,** 2011b. Characterization of a novel arginine catabolic mobile element (ACME) and staphylococcal chromosomal cassette *mec* composite island with significant homology to *Staphylococcus epidermidis* ACME type II in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotype ST22-MRSA-IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1896–1905. <https://doi.org/10.1128/AAC.01756-10>
- Shore, A.C., Tecklenborg, S.C., Brennan, G.I., Ehricht, R., Monecke, S., Coleman, D.C.,** 2014. Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Ireland from 2002 to 2011: 21 clones, frequent importation of clones, temporal shifts of predominant methicillin-resistant *S. aureus* clones, and increasing multiresistance. *J. Clin. Microbiol.* 52, 859–870. <https://doi.org/10.1128/JCM.02799-13>
- Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A.,** 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2797–2803. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2797-2803.2002>
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M.,** 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, 32–36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>
- Silva, N.C.C., Guimarães, F.F., Manzi, M.P., Júnior, A.F., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Langoni, H., Rall, V.L.M., Torres, C.,** 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. *Let. Appl. Microbiol.* 59, 665–669. <https://doi.org/10.1111/lam.12329>

- Silva, V., Capelo, J.L., Igrejas, G., Poeta, P.,** 2020. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* lineages in wild animals in Europe: A review. *Antibiotics* 9, 1–28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030122>
- Smith, L.K., Mankin, A.S.,** 2008. Transcriptional and translational control of the *mlr* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1703–1712. <https://doi.org/10.1128/AAC.01583-07>
- Soares Magalhães, R.J., Loeffler, A., Lindsay, J., Rich, M., Roberts, L., Smith, H., Lloyd, D.H., Pfeiffer, D.U.,** 2010. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in dogs and cats: A case-control study. *Vet. Res.* 41. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010028>
- Solyman, S.M., Black, C.C., Duim, B., Perreten, V., Van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., Eberlein, L.C., Sadeghi, L.N., Videla, R., Bemis, D.A., Kania, S.A.,** 2013. Multilocus sequence typing for characterization of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.* 51, 306–310. <https://doi.org/10.1128/JCM.02421-12>
- Somayaji, R., Priyantha, M.A.R., Rubin, J.E., Church, D.,** 2016a. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85, 471–476. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.008>
- Somayaji, R., Rubin, J.E., Priyantha, M.A.R., Church, D.,** 2016b. Exploring *Staphylococcus pseudintermedius*: an emerging zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* 11, 1371–1374. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0137>
- Sousa, M., Silva, N., Igrejas, G., Sargo, R., Benito, D., Gómez, P., Lozano, C., Manageiro, V., Torres, C., Caniça, M., Poeta, P.,** 2016. Genetic diversity and antibiotic resistance among coagulase-negative staphylococci recovered from birds of prey in Portugal. *Microb. Drug Resist.* 22, 727–730. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0266>
- Sousa, M., Silva, N., Igrejas, G., Silva, F., Sargo, R., Alegria, N., Benito, D., Gómez, P., Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Torres, C., Caniça, M., Poeta, P.,** 2014. Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp. recovered from birds of prey in Portugal. *Vet. Microbiol.* 171, 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.034>
- Stegger, M., Lindsay, J.A., Moodley, A., Skov, R., Broens, E.M., Guardabassi, L.,** 2011. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying *sau1-hsdS1*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 732–734. <https://doi.org/10.1128/JCM.01970-10>
- Stegger, M., Lindsay, J.A., Sørum, M., Gould, K.A., Skov, R.,** 2010. Genetic diversity in CC398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of different geographical origin. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1017–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03003.x>
- Sudagidan, M., Aydin, A.,** 2012. Virulence properties of *Staphylococcus delphini* strains isolated from domestic pigeons. *Med. Weter.* 68, 231–236.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., Wondrack, L.,** 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2562–2566. <https://doi.org/10.1128/aac.40.11.2562>

- Takahata, M., Yonezawa, M., Matsubara, N., Watanabe, Y., Narita, H., Matsunaga, T., Igarashi, H., Kawahara, M., Onodera, S., Oishi, Y.**, 1997. Antibacterial activity of quinolones against coagulase-negative staphylococci and the quinolone resistance-determining region of the *gyrA* genes from six species. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 383–386. <https://doi.org/10.1093/jac/40.3.383>
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.**, 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Tewhey, R., Gu, B., Kelesidis, T., Charlton, C., Bobenchik, A., Hindler, J., Schork, N.J., Humphries, R.M.**, 2014. Mechanisms of linezolid resistance among coagulase-negative staphylococci determined by whole-genome sequencing. *MBio* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00894-14>
- Thomas, J.C., Vargas, M.R., Miragaia, M., Peacock, S.J., Archer, G.L., Enright, M.C.**, 2007. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 616–619. <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-06>
- Torres, C., Alonso, C.A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., Coque, T.M.**, 2018. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectr.* 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0032-2018>
- Tsiodras, S., Gold, H.S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R.C., Ferraro, M.J.**, 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358, 207–208. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05410-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05410-1)
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K.**, 2010. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4352–4359. <https://doi.org/10.1128/AAC.00356-10>
- Udo, E.E.**, 1993. Genetic analysis of community isolates of *Staphylococcus aureus* in Western Austria. *J. Hosp. Infect.* 97–108.
- Udo, E.E., Al-Sweih, N., Noronha, B.C.**, 2003. A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high level mupirocin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1283–1286. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg188>
- Ugwu, C.C., Gomez-Sanz, E., Agbo, I.C., Torres, C., Chah, K.F.**, 2015. Characterization of mannitol-fermenting methicillin-resistant staphylococci isolated from pigs in Nigeria. *Brazilian J. Microbiol.* 46, 885–892. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140644>
- Ukpanah, M., Upla, P.**, 2017. Why is *Staphylococcus aureus* such a successful pathogen? *Microbiol. Res. J. Int.* 19, 1–22. <https://doi.org/10.9734/mrji/2017/31761>
- Ünal, N., Çınar, O.D.**, 2012. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 369–375. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0032-x>

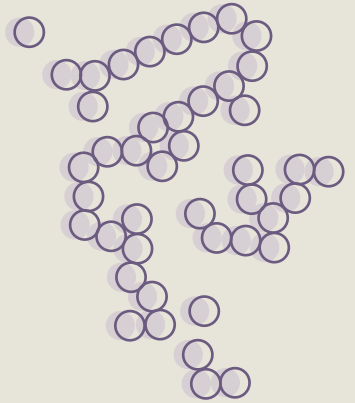
- van de Klundert, J., Vliegthart, J., 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, in: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. pp. 547–552. <https://doi.org/10.1023/A:1016601629518>
- Van der Mee-Marquet, N., Corvaglia, A.R., Valentin, A.S., Hernandez, D., Bertrand, X., Girard, M., Kluytmans, J., Donnio, P.Y., Quentin, R., François, P., 2013. Analysis of prophages harbored by the human-adapted subpopulation of *Staphylococcus aureus* CC398. *Infect. Genet. Evol.* 18, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.009>
- van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S., Ružauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J., Törneke, K., 2011. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2705–2714. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr367>
- Van Duijkeren, E., Jansen, M.D., Flemming, S.C., De Neeling, H., Wagenaar, J.A., Schoormans, A.H.W., Van Nes, A., Fluit, A.C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative dermatitis. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1408–1410. <https://doi.org/10.3201/eid1309.061268>
- Van Duijkeren, E., Wolfhagen, M.J.H.M., Box, A.T.A., Heck, M.E.O.C., Wannet, W.J.B., Fluit, A.C., 2004. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2235–2237. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040387>
- Van Wamel, W.J.B., Rooijackers, S.H.M., Kessel, K.P.M. Van, Strijp, J. a G. Van, Ruyken, M., 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* 188, 1310–1315. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1310>
- Vandendriessche, S., Vanderhaeghen, W., Larsen, J., de Mendonça, R., Hallin, M., Butaye, P., Hermans, K., Haesebrouck, F., Denis, O., 2014. High genetic diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from humans and animals on livestock farms and presence of SCCmec remnant DNA in MSSA CC398. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 355–362. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt366>
- Vanderhaeghen, W., Vandendriessche, S., Crombé, F., Nemegehaire, S., Dispas, M., Denis, O., Hermans, K., Haesebrouck, F., Butaye, P., 2013. Characterization of methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci carriage isolates from different bovine populations. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 300–307. <https://doi.org/10.1093/jac/dks403>
- Valardo, P.E., Kilpper-Balz, R., Biavasco, F., Satta, G., Schleifer, K.H., 1988. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 436–439. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-4-436>
- Verdon, J., Girardin, N., Lacombe, C., Berjeaud, J.M., Héchard, Y., 2009. Δ -hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 30, 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.017>
- Verkaik, N.J., Benard, M., Boelens, H.A., De Vogel, C.P., Nouwen, J.L., Verbrugh, H.A., Melles, D.C., Van Belkum, A., Van Wamel, W.J.B., 2011. Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first

- stages of nasal colonization. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 343–348. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03227.x>
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M.**, 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965–1966. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050428>
- Vrbovská, V., Sedláček, I., Zeman, M., Švec, P., Kovařovic, V., Šedo, O., Laichmanová, M., Doškař, J., Pantůček, R.**, 2020. Characterization of *Staphylococcus intermedius* group isolates associated with animals from antarctica and emended description of *Staphylococcus delphini*. *Microorganisms* 8, 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020204>
- Waglechner, N., Wright, G.D.**, 2017. Antibiotic resistance: It's bad, but why isn't it worse? *BMC Biol.* 15, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0423-1>
- Wan, M.T., Lauderdale, T.L., Chou, C.C.**, 2013. Characteristics and virulence factors of livestock associated ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel recombinant staphylocoagulase type. *Vet. Microbiol.* 162, 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.003>
- Wang, Y., Lin, D.C., Guo, X.M., Wei, H.K., Liu, X.Q., Chen, X.J., Guo, J.Y., Zeng, Z.L., Liu, J.H.**, 2015a. Distribution of the multidrug resistance gene *cf*r in *Staphylococcus* isolates from pigs, workers, and the environment of a hog market and a slaughterhouse in Guangzhou, China. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 598–605. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1891>
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A.T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., Shen, J.**, 2015b. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2182–2190. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv116>
- Wang, Y., Zhang, W., Wang, J., Wu, C., Shen, Z., Fu, X., Yan, Y., Zhang, Q., Schwarz, S., Shen, J.**, 2012. Distribution of the multidrug resistance gene *cf*r in *Staphylococcus* species isolates from swine farms in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1485–1490. <https://doi.org/10.1128/AAC.05827-11>
- Wannet, W.J.B., Duijkeren, E. Van, Wolfhagen, M.J.H.M., Heck, M.E.O.C.**, 2005. Transmission of a Panton-Valentine *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. *J. Clin. Microbiol.* 43, 8–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6209>
- Wardenburg, J.B., Palazzolo-Ballance, A.M., Otto, M., Schneewind, O., Deleo, F.R.**, 2008. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J. Infect. Dis.* 198, 1166–1170. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Weese, J.S., van Duijkeren, E.**, 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 140, 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039>
- Welinder-Olsson, C., Florén-Johansson, K., Larsson, L., Oberg, S., Karlsson, L., Ahrén, C.**, 2008. Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1271–1272. <https://doi.org/10.1086/313461>

- Wendlandt, S., Feßler, A.T., Monecke, S., Ehricht, R., Schwarz, S., Kadlec, K.**, 2013. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.006>
- Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L.**, 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A.L., Connell, S.R., Fucini, P.**, 2008. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13339–13344. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804276105>
- Wipf, J.R.K., Perreten, V.**, 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 158, 443–450. <https://doi.org/10.17236/sat00070>
- Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C.**, 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 255–258. <https://doi.org/10.3201/eid1302.060924>
- Wondrack, L., Massa, M., Yang, B. V., Sutcliffe, J.**, 1996. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 992–998. <https://doi.org/10.1128/aac.40.4.992>
- Woodford, N., Morrison, D., Johnson, A.P., Briant, V., George, R.C., Cookson, B.**, 1993. Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 31, 653–658. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.3.653-658.1993>
- Worthing, K.A., Abraham, S., Coombs, G.W., Pang, S., Saputra, S., Jordan, D., Trott, D.J., Norris, J.M.**, 2018. Clonal diversity and geographic distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Australian animals: Discovery of novel sequence types. *Vet. Microbiol.* 213, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.018>
- Wright, G.D.**, 2010. Q&A: Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* 8. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Wu, Y., Fan, R., Wang, Y., Lei, L., Feßler, A.T., Wang, Z., Wu, C., Schwarz, S., Wang, Y.**, 2019. Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items. *Sci. Rep.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51918-y>
- Yamada, M., Yoshida, J., Hatou, S., Yoshida, T., Minagawa, Y.**, 2008. Mutations in the quinolone resistance determining region in *Staphylococcus epidermidis* recovered from conjunctiva and their association with susceptibility to various fluoroquinolones. *Br. J. Ophthalmol.* 92, 848–851. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.129858>
- Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher Amagai, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Aepfelbacher Amagai, M., Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M., Sugai, M.**, 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel

- exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect. Immun.* 70, 5835–5845. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5835>
- Ye, X., Wang, X., Fan, Y., Peng, Y., Li, L., Li, S., Huang, J., Yao, Z., Chen, S.,** 2016. Genotypic and phenotypic markers of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC9 in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3892–3899. <https://doi.org/10.1128/AEM.00091-16>
- Yu, F., Chen, Z., Liu, C., Zhang, X., Lin, X., Chi, S., Zhou, T., Chen, Z., Chen, X.,** 2008. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 381–384. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01927.x>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., Larsen, M.V.,** 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zarazaga, M., Gómez, P., Ceballos, S., Torres, C.,** 2018. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* lineages in the animal–human interface, in: *Staphylococcus aureus*. Elsevier Inc., pp. 189–214. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809671-0.00010-3>
- Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Götz, F.,** 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.016>
- Zeng, Z.L., Wei, H.K., Wang, J., Lin, D.C., Liu, X.Q., Liu, J.H.,** 2014. High prevalence of Cfr-producing *Staphylococcus* species in retail meat in Guangzhou, China. *BMC Microbiol.* 14, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-151>
- Zhang, C., Guo, L., Chu, X., Shen, L., Guo, Y., Dong, H., Mao, J., Van Der Veen, S.,** 2016. Presence of the Panton-Valentine leukocidin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with severity and clinical outcome of hospital-acquired pneumonia in a single center study in China. *PLoS One* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156704>
- Zhang, K., McClure, J., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J.M.,** 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome. *Microbiology* 143, 5026–5033. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5026>
- Zhang, W., Hao, Z., Wang, Y., Cao, X., Logue, C.M., Wang, B., Yang, J., Shen, J., Wu, C.,** 2011. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and veterinary staff in China. *Vet. J.* 190, e125–e129. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.006>
- Zhang, Y., Agidi, S., Lejeune, J.T.,** 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1375–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04322.x>
- Zhang, Y., Dong, G., Li, J., Chen, L., Liu, H., Bi, W., Lu, H., Zhou, T.,** 2018. A high incidence and coexistence of multiresistance genes *cfr* and *optrA* among linezolid-resistant enterococci isolated from a teaching hospital in Wenzhou, China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 1441–1448. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3269-8>

Anexos



ANEXO I. *Staphylococcus* spp. de muestras traqueales de aves silvestres

Tabla S1. Características de las aves silvestres muestreadas

| Especie | Comportamiento migratorio | Comportamiento social | Dieta | Potencial uso de muladares | Alimentación en vertederos |
|---|---|-----------------------|--|----------------------------|----------------------------|
| Buitre negro (<i>Aegypius monachus</i>) | Residente | Gregario | Principalmente pequeñas carroñas, sobre todo conejo, pero también carroñas de ungulados | Si | Si |
| Urraca (<i>Pica pica</i>) | Residente | Territorial | Omnívoro | Ocasionalmente | No |
| Milano real (<i>Milvus milvus</i>) | Residente e invernante | Gregario | Mayormente carroña de animales de pequeño tamaño, incluyendo conejos, aves micromamíferos, anfibios, reptiles e insectos. | SI | Si |
| Ibis eremita | Originalmente migratorio, población actual reintroducida principalmente residente | Gregario | Principalmente a base de insectos y otros invertebrados, aunque en ocasiones también consume reptiles, anfibios, peces e incluso pequeños mamíferos. | No | No |
| Quebrantahuesos (<i>Gypaetus barbatus</i>) | Residente | Territorial | Carroña (huesos) de grandes ungulados y pequeños vertebrados | Si | No |
| Gaviota reidora (<i>Chroicocephalus ridibundus</i>) | Residente | Gregario | Insectos, anélidos, pequeños crustáceos y pececillos, alimentos de origen vegetal | No | Si |
| Alimoche (<i>Neophron percnopterus</i>) | Mayormente migratorio estival en España, pero también población residente | Territorial | Carroñas de pequeños y medianos animales | Si | Si |

| Espece | Comportamiento migratorio | Comportamiento social | Dieta | Potencial uso de muladares | Alimentación en vertederos |
|--|---------------------------|-----------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| Abejero europeo (<i>Pernis apivorus</i>) | Migratorio | Gregario | Avispas abejorros y otros invertebrados, y también pequeños vertebrados | No | No |
| Aguilucho lagunero (<i>Circus aeruginosus</i>) | Residente | Gregario | Pequeños y medianos vertebrados, ocasionalmente carroña | Ocasionalmente | No |

Tabla S2. Lugares, fechas y número de aves silvestres muestreadas.

| Espece | Fecha de muestreo | Número de animales muestreados | Localización |
|---|-------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Urraca (<i>Pica pica</i>) | 20/07/2015 | 5 | Miguelturra, Ciudad Real |
| | 05/05/2016 | 7 | Daimiel, Ciudad Real |
| | 09/05/2016 | 7 | Miguelturra, Ciudad Real |
| | 12/05/2016 | 8 | Daimiel, Ciudad Real |
| | 17/05/2016 | 8 | Daimiel, Ciudad Real |
| | 13/06/2016 | 7 | Miguelturra, Ciudad Real |
| | 11/07/2016 | 3 | Castellón |
| | 18/07/2016 | 14 | Valencia |
| Milano (<i>Milvus milvus</i>) | 01/11/2015 | 14 | Binaced, Huesca |
| | 20/02/2016 | 24 | Binaced, Huesca |
| Gaviota reidora (<i>Chroicocephalus ridibundus</i>) | 08/05/2015 | 6 | Almagro, Ciudad Real |
| | 15/06/2015 | 6 | Rascafría, Madrid |
| Buitre negro (<i>Aegypius monachus</i>) | 16/06/2015 | 4 | Rascafría, Madrid |
| | 17/06/2015 | 5 | Rascafría, Madrid |
| | 25/06/2015 | 8 | Rascafría, Madrid |
| | 26/06/2015 | 6 | Rascafría, Madrid |
| | 29/06/2015 | 4 | Rascafría, Madrid |
| | 03/07/2015 | 4 | Rascafría, Madrid |
| | 05/07/2015 | 2 | Rascafría, Madrid |
| | 06/07/2015 | 3 | Rascafría, Madrid |
| | 10/07/2015 | 8 | Rascafría, Madrid |
| | 13/07/2015 | 3 | Rascafría, Madrid |
| | 08/06/2016 | 4 | Rascafría, Madrid |
| | 09/06/2016 | 5 | Rascafría, Madrid |

| Especie | Fecha de muestreo | Número de animales muestreados | Localización |
|--|--------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Buitre negro (<i>Aegypius monachus</i>) | 15/06/2016 | 10 | Rascafría, Madrid |
| | 28/06/2016 | 3 | Rascafría, Madrid |
| | 29/06/2016 | 2 | Rascafría, Madrid |
| | 30/06/2018 | 7 | Rascafría, Madrid |
| | 18/07/2016 | 5 | Rascafría, Madrid |
| | 19/07/2016 | 4 | Rascafría, Madrid |
| | 22/07/2016 | 4 | Rascafría, Madrid |
| | 27/07/2016 | 1 | Rascafría, Madrid |
| Quebrantahuesos (<i>Gypaetus barbatus</i>) | 11/06/2015 | 2 | Huesca |
| | 08/06/2015 | 2 | Huesca |
| | 13/11/2015 | 2 | Garcipollera, Huesca |
| | 29/05/2016 | 2 | Huesca |
| | 30/05/2016 | 1 | Huesca |
| Abejero europeo (<i>Pernis apivorus</i>) | 27/07/2016 | 2 | Segovia |
| Aguilucho lagunero (<i>Circus aeruginosus</i>) | 20/02/2016 | 1 | Binaced, Huesca |
| Alimoche (<i>Neophron percnopterus</i>) | 20/07/2016 | 2 | Guadalajara |
| Ibis eremita (<i>Geronticus eremita</i>) | 16/06/2016 | 2 | La Barca, Cádiz |
| | 17/06/2016 | 25 | El Retín, Cádiz |

Tabla S3. Fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos y contenido de genes de virulencia detectado en las 173 cepas SCoN aisladas de muestras traqueales de aves silvestres.

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|------------------|-------------|-----------------|-------------------------------|---|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9166 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9167 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2015 | CLI-TET-FUS | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| C9174 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>sal(A)</i> | - |
| C9175 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9177 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-FUS | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9179 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>sal(A)</i> | - |
| C9181 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9183 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>sal(A)</i> | - |
| C9185 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9186 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9188 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9191 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>sal(A)</i> | - |
| C9193 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-FUS | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9194 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-FUS | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9197 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-TET-FUS | <i>sal(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| C9198 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | PEN-FOX-CLI-TET-FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| C9200 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-TET-FUS | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> | - |
| C9202 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI-FUS | <i>Inu(A)</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9203 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I | <i>sal(A)</i> | - |
| C9206 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9207 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9208 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | CLI-FUS | <i>lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9211 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | ERI-CLI-FUS | <i>erm(C), sal(A)</i> | - |
| C9212 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9213 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9214 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9215 | <i>S. sciuri</i> | Milano real | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9216 | <i>S. sciuri</i> | Gaviota reidora | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9217 | <i>S. sciuri</i> | Gaviota reidora | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9218 | <i>S. sciuri</i> | Gaviota reidora | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>blaZ, sal(A)</i> | - |
| C9219 | <i>S. sciuri</i> | Gaviota reidora | 2015 | PEN-ERI-CLI ^I -FUS | <i>erm(C), lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9220 | <i>S. sciuri</i> | Gaviota reidora | 2015 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9222 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-ERI-CLI-STR-TET-FUS | <i>mecA, erm(B), lnu(A), sal(A), str, tet(M)</i> | - |
| C9223 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9224 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9225 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9226 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>blaZ, sal(A)</i> | - |
| C9227 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9229 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9230 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-CLO-FUS | <i>lnu(A), sal(A), fexA</i> | - |
| C9231 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9232 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9233 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9234 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-STR-FUS | <i>sal(A), str</i> | - |
| C9235 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9236 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-CLO-FUS | <i>sal(A), fexA</i> | - |
| C9238 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9239 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9240 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9244 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9245 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9246 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9248 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9249 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI-STR-FUS | <i>mecA, sal(A), str</i> | - |
| C9252 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9256 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | ERI-CLI-FUS | <i>erm(B), erm(C), sal(A)</i> | - |
| C9258 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | ERI-CLI-TOB-CIP-FUS | <i>erm(B), msr(A), sal(A), ant(4['])-Ia</i> | - |
| C9260 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9262 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | ERI-CLI ^I -FUS | <i>erm(C), sal(A)</i> | - |
| C9263 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | PEN-FOX-CLI-TOB-FUS | <i>mecA, blaZ, sal(A), ant(4['])-Ia</i> | - |
| C9264 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2015 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9266 | <i>S. sciuri</i> | Quebrantahuesos | 2015 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9270 | <i>S. sciuri</i> | Quebrantahuesos | 2016 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9274 | <i>S. sciuri</i> | Aguilucho lagunero | 2016 | CLI ^I | <i>sal(A)</i> | - |
| C9462 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-FOX-CLI-STR-FUS | <i>mecA, sal(A), str</i> | - |
| C9464 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-ERI-CLI-FUS | <i>erm(B), erm(C), sal(A)</i> | - |
| C9465 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | CLI-FUS | <i>lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9466 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-CLI-FUS | <i>blaZ, lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9467 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-CLI-GEN-TOB-FUS | <i>sal(A), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> | - |
| C9468 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9470 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9471 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9472 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9473 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9474 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9475 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-CLI-FUS | <i>blaZ, sal(A)</i> | - |
| C9476 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-FOX-ERI-CLI-FUS | <i>mecA, erm(C), lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9477 | <i>S. sciuri</i> | Urraca | 2016 | PEN-FOX-CLI-STR-FUS | <i>mecA, sal(A), str</i> | - |
| C9478 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9479 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | ERI-CLI-STR-FUS | <i>erm(B), sal(A), str</i> | - |
| C9480 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -STR-FUS | <i>sal(A), str</i> | - |
| C9481 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9483 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|------------------|--------------|-----------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9484 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-STR-TET-FUS | <i>lnu(A), sal(A), str, tet(L)</i> | - |
| C9487 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9488 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-FUS | <i>lnu(A), sal(A)</i> | - |
| C9489 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9491 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9493 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI-FUS | <i>blaZ, sal(A)</i> | - |
| C9494 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9497 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9498 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9499 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-ERI-CLI-FUS | <i>erm(C), sal(A)</i> | - |
| C9501 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | <i>tst</i> |
| C9502 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -TET-FUS | <i>sal(A), tet(K)</i> | - |
| C9503 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-ERI-CLI-FUS | <i>erm(C), sal(A)</i> | <i>tst</i> |
| C9505 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-GEN-TOB-FUS | <i>lsa(B), sal(A), aac(6')-le-aph(2'')-la</i> | - |
| C9506 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-FOX-CLI ^I -TOB-FUS | <i>mecA, sal(A), ant(4')-la</i> | - |
| C9509 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9512 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9513 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I | <i>mecA, sal(A)</i> | - |
| C9514 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI ^I -GEN-TOB-FUS | <i>sal(A), aac(6')-le-aph(2'')-la,</i> | - |
| C9515 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-FOX-CLI ^I -STR-FUS | <i>mecA, sal(A), str</i> | - |
| C9516 | <i>S. sciuri</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|------------------|-----------------|-----------------|---|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9517 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9518 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-CLI-FUS | <i>blaZ</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9519 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9520 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9521 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9522 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9523 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9525 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-FOX-CLI-FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9526 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9527 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-CLI ^I -TET-FUS | <i>sal(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| C9528 | <i>S. sciuri</i> | Ibis eremita | 2016 | CLI ^I -FUS | <i>mecA</i> , <i>sal(A)</i> | - |
| C9529 | <i>S. sciuri</i> | Alimoche | 2016 | CLI | <i>sal(A)</i> | - |
| C9530 | <i>S. sciuri</i> | Alimoche | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9533 | <i>S. sciuri</i> | Abejero europeo | 2016 | CLI-FUS | <i>sal(A)</i> | - |
| C9173 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | ERI-CLI ^{III} -TET-FUS | <i>erm(B)</i> , <i>erm(43)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>tet(M)</i> | - |
| C9176 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | CLI-FUS | <i>lnu(A)</i> , <i>lsa(B)</i> | - |
| C9180 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^b -FUS | <i>mecA</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(43)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>tet(M)</i> | - |
| C9182 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | PEN-FOX-ERI-CLI-STR-TET-CIP ^b -FUS | <i>mecA</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(43)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> | - |
| C9184 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | CLI ^I -TET-FUS | <i>lnu(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| C9187 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | CLI-STR-TET-FUS | <i>lnu(A)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| C9189 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | PEN-ERI-CLI-FUS | <i>blaZ</i> , <i>erm(C)</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|----------------------|--------------------|-----------------|---|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9190 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | ERI-CLI-TET-CIP ^b -FUS | <i>erm(B), mph(C), tet(M)</i> | - |
| C9192 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | ERI-CLI-TET-FUS | <i>erm(B), erm(43), mph(C), lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9195 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | PEN-FOX-ERI-CLI-CIP ^b -FUS | <i>mecA, blaZ, erm(C), mph(C)</i> | - |
| C9196 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | CLI-TET-FUS | <i>lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9199 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | PEN-FOX-CLI ^l -TET-FUS | <i>mecA, tet(K)</i> | - |
| C9201 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | ERI-CLI-FUS | <i>erm(B), erm(43), mph(C)</i> | - |
| C9204 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | ERI-CLI-TET | <i>erm(C), tet(K)</i> | - |
| C9205 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2016 | CLI ^l -TET-FUS | <i>lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9209 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2015 | CLI ^l -TET-FUS | <i>lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9210 | <i>S. lentus</i> | Milano real | 2015 | PEN-FOX-ERI-CLI-TET-CIP ^b -FUS | <i>mecA, blaZ, erm(C), erm(43), mph(C), tet(K)</i> | - |
| C9250 | <i>S. lentus</i> | Buitre negro | 2015 | ERI-CLI | <i>erm(B), erm(43), mph(C)</i> | - |
| C9251 | <i>S. lentus</i> | Buitre negro | 2015 | ERI ^l -CLI ^l | <i>erm(B), mph(C)</i> | - |
| C9254 | <i>S. lentus</i> | Buitre negro | 2015 | CLI-TET-FUS | <i>lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9265 | <i>S. lentus</i> | Quebrantahuesos | 2015 | CLI-TOB-STR-TET-SXT | <i>lnu(A), ant(4')-Ia, str, tet(K), tet(L), tet(M), dfrK</i> | - |
| C9272 | <i>S. lentus</i> | Aguilucho lagunero | 2016 | PEN-CLI ^l -FUS | <i>lnu(A)</i> | - |
| C9482 | <i>S. lentus</i> | Buitre negro | 2016 | FUS | | - |
| C9510 | <i>S. lentus</i> | Buitre negro | 2016 | ERI-CLI-FUS | <i>erm(B)</i> | - |
| C9511 | <i>S. lentus</i> | Buitre negro | 2016 | CLI-FUS | <i>lnu(A)</i> | - |
| C9268 | <i>S. fleurettii</i> | Quebrantahuesos | 2015 | PEN-FOX-CLI ^l -STR-FUS | <i>mecA, str</i> | - |
| C9485 | <i>S. fleurettii</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-FOX-CLI ^l -FUS | <i>mecA</i> | - |
| C9486 | <i>S. fleurettii</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-FOX-CLI ^l -STR-FUS | <i>mecA, str</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|---|--------------------|-----------------|-----------------------------------|---|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9492 | <i>S. fleurettii</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-FOX-CLI ^I -STR-FUS | <i>mecA, str</i> | - |
| C9495 | <i>S. fleurettii</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-FOX-FUS | <i>mecA</i> | - |
| C9504 | <i>S. fleurettii</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI ^I -FUS | <i>mecA</i> | - |
| C9507 | <i>S. fleurettii</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI-FUS | <i>mecA, lnu(A)</i> | - |
| C9168 | <i>S. vitulinus</i> | Urraca | 2016 | FUS | | - |
| C9171 | <i>S. vitulinus</i> | Urraca | 2016 | PEN-FOX-STR-FUS | <i>mecA, str</i> | - |
| C9172 | <i>S. vitulinus</i> | Urraca | 2016 | CLI | | - |
| C9273 | <i>S. vitulinus</i> | Aguilucho lagunero | 2016 | CLI ^I -FUS | | - |
| C9463 | <i>S. vitulinus</i> | Urraca | 2016 | PEN-FOX-FUS | <i>mecA</i> | - |
| C9490 | <i>S. vitulinus</i> | Buitre negro | 2016 | STR-GEN-TOB-FUS | <i>aac(6['])-le-aph(2['])-la, str</i> | - |
| C9163 | <i>S. epidermidis</i> | Urraca | 2015 | PEN-ERI-CLI-FUS | <i>blaZ, erm(C), lnu(A), fusB</i> | - |
| C9170 | <i>S. epidermidis</i> | Urraca | 2016 | PEN-FOX-CLI ^I -FUS | <i>mecA, lnu(A), vga(A)</i> | - |
| C9271 | <i>S. epidermidis</i> | Quebrantahuesos | 2016 | PEN-FOX-ERI-CLI ^I -TET | <i>mecA, blaZ, erm(C), mph(C), lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9524 | <i>S. epidermidis</i> | Ibis eremita | 2016 | PEN-ERI-CLI | <i>blaZ, erm(C), mph(C)</i> | - |
| C9259 | <i>S. kloosii</i> | Buitre negro | | PEN-CLI-TET-FUS | <i>blaZ, lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9532 | <i>S. kloosii</i> | Abejero europeo | 2016 | PEN-FUS | <i>blaZ</i> | - |
| C9534 | <i>S. kloosii</i> | Abejero europeo | 2016 | PEN-FUS | <i>blaZ</i> | - |
| C9267 | <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> | Quebrantahuesos | 2015 | CLI-STR-TET | <i>lnu(A), str, tet(K)</i> | - |
| C9269 | <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> | Quebrantahuesos | 2015 | CLI ^I -STR-TET | <i>lnu(A), str, tet(K)</i> | - |
| C9508 | <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> | Buitre negro | | PEN-STR-TET | <i>blaZ, str, tet(K)</i> | - |
| C9255 | <i>S. xylosus</i> | Buitre negro | | PEN | <i>blaZ</i> | - |

| Cepa | Especie | Origen | Año de muestreo | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|-------|-------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| | | | | Fenotipo ^a | Genotipo | |
| C9275 | <i>S. xylosus</i> | Aguilucho lagunero | 2016 | PEN-ERI-CLI-TET-FUS | <i>erm(B), mph(C), lnu(A), tet(K)</i> | - |
| C9500 | <i>S. xylosus</i> | Buitre negro | 2016 | PEN-CLI-STR-CIP-FUS | <i>str</i> | - |
| C9496 | <i>S. saprophyticus</i> | Buitre negro | 2016 | PEN | <i>blaZ, fusD</i> | - |
| C9531 | <i>S. saprophyticus</i> | Abejero europeo | 2016 | GEN-TOB-FUS | <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, fusD</i> | - |
| C9164 | <i>S. capitis</i> | Urraca | 2015 | Sensible | | - |
| C9469 | <i>S. succinus</i> | Urraca | 2016 | PEN | <i>blaZ</i> | - |

^aI, resistencia intermedia; In, resistencia inducible.

^bCambios aminoacídicos en las proteínas GyrA (S84L) y GrIA (D84E y M89L).

Tabla S4. Tipado del SCCmec de las 47 cepas SCoN portadoras del gen *mecA* aisladas de muestras traqueales de aves silvestres según los dos esquemas diferentes de cebadores utilizados.

| Cepa ^a | Kondo <i>et al.</i> , 2007 | | | Zhang <i>et al.</i> , 2005 | SCCmec |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------|--------|----------------------------|--------|
| | <i>ccr</i> | Complejo <i>mec</i> | SCCmec | SCCmec | |
| <i>S. sciuri</i> C9166 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9186 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9198 | - | A | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9207 | <i>ccrA3-ccrB3</i> | A | III | III | III |
| <i>S. sciuri</i> C9212 | <i>ccrA2-ccrB2, ccrA3-ccrB3</i> | A | - | I | - |
| <i>S. sciuri</i> C9215 | <i>ccrA3-ccrB3</i> | A | III | III | III |
| <i>S. sciuri</i> C9217 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9220 | - | - | - | IVb | - |
| <i>S. sciuri</i> C9222 | <i>ccrA2-ccrB2, ccrA3-ccrB3</i> | A | - | III | - |
| <i>S. sciuri</i> C9227 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9230 | - | - | - | IVc | - |
| <i>S. sciuri</i> C9233 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9238 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9240 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9244 | - | - | - | IVc | - |
| <i>S. sciuri</i> C9249 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9260 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9263 | <i>ccrA3-ccrB3</i> | A | III | III | III |
| <i>S. sciuri</i> C9270 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9462 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9476 | <i>ccrA1-ccrB1, ccrA3-ccrB3</i> | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9477 | <i>ccrA1-ccrB1, ccrA3-ccrB3</i> | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9506 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9513* | <i>ccrA3-ccrB3</i> | A | III | III | III |
| <i>S. sciuri</i> C9515 | <i>ccrA2-ccrB2</i> | A | II | II | - |
| <i>S. sciuri</i> C9517* | <i>ccrA3-ccrB3</i> | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9519 | - | - | - | I | - |
| <i>S. sciuri</i> C9520 | - | - | - | I | - |
| <i>S. sciuri</i> C9521 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9522 | - | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9525 | <i>ccrA3-ccrB3</i> | - | - | - | - |
| <i>S. sciuri</i> C9528* | - | - | - | - | - |
| <i>S. lentus</i> C9180 | <i>ccrC</i> | - | - | IVb | - |
| <i>S. lentus</i> C9182 | - | A | - | IVb | - |
| <i>S. lentus</i> C9195 | - | - | - | IVb | - |

| Cepa ^a | Kondo et al., 2007 | | | Zhang et al., 2005 | SCCmec |
|-----------------------------|--------------------|--------------|--------|--------------------|--------|
| | ccr | Complejo mec | SCCmec | SCCmec | |
| <i>S. lentus</i> C9199 | - | A | | | |
| <i>S. lentus</i> C9210 | - | A | | IVb | |
| <i>S. epidermidis</i> C9170 | ccrC | - | | | |
| <i>S. epidermidis</i> C9271 | ccrA2-ccrB2 | A | II | | |
| <i>S. vitulinus</i> C9171 | - | - | | | |
| <i>S. vitulinus</i> C9172 | - | - | | | |
| <i>S. vitulinus</i> C9463 | - | - | | | |
| <i>S. fleurettii</i> C9268 | - | - | | | |
| <i>S. fleurettii</i> C9485 | - | A | | IVc | |
| <i>S. fleurettii</i> C9486 | - | A | | | |
| <i>S. fleurettii</i> C9492 | - | A | | | |
| <i>S. fleurettii</i> C9495 | - | A | | | |
| <i>S. fleurettii</i> C9504* | - | A | | IVc | |
| <i>S. fleurettii</i> C9507* | - | A | | IVc | |

^aLas cepas marcadas con un asterisco son las que no mostraron un fenotipo de resistencia a meticilina.

ANEXO II. *Staphylococcus* spp. de muestras ambientales de granjas porcinas

Tabla S4. Fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos y contenido en genes de virulencia de las cepas SCoN aisladas de muestras de aire de dos granjas porcinas con diferente sistema de producción.

| Cepa | Especie | Granja | Origen ^a | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|------|--------------------|--------|---------------------|--|---|---------------------|
| | | | | Fenotipo de resistencia a antibióticos | Genotipo de resistencia a antibióticos | |
| X114 | <i>S. arlettae</i> | PI | A | PEN-ERI-CLI-STR-TET-CLO-FFN-LZD-SXT | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>lsa(B)</i> , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>fexA</i> , <i>cfr</i> , <i>dfrD</i> | - |
| X125 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>lnu(A)</i> | - |
| X126 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(M)</i> | - |
| X127 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> | - |
| X128 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| X130 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>vga(A)</i> | - |
| X131 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| X132 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> | - |
| X133 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| X134 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-STR | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>str</i> | - |
| X135 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>lnu(A)</i> | - |
| X136 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI- TET-FUS | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| X137 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>vga(A)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>tet(K)</i> | - |
| X138 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-CLO | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>lnu(A)</i> , <i>cat_{PO221}</i> | - |
| X139 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>blaZ_{ARL}</i> , <i>erm(C)</i> , <i>msr(A)</i> , <i>mph(C)</i> , <i>tet(K)</i> | - |

| Cepa | Especie | Granja | Origen ^a | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|------|---------------------------------------|--------|---------------------|--|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo de resistencia a antibióticos | Genotipo de resistencia a antibióticos | |
| X141 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>bla</i> _{Z_{ARL}} , <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>mph</i> (C), <i>tet</i> (K) | - |
| X142 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-TET | <i>bla</i> _{Z_{ARL}} , <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>mph</i> (C), <i>tet</i> (K) | - |
| X143 | <i>S. arlettae</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI | <i>bla</i> _{Z_{ARL}} , <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>mph</i> (C) | - |
| X95 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | PEN-ERI-CLI-STR-TET-FUS-SXT | <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>dfrK</i> | - |
| X100 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | ERI-CLI-TET-FUS-SXT | <i>msr</i> (A), <i>mph</i> (C), <i>vga</i> (A), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>dfrK</i> | - |
| X102 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | CLI-STR-TET-FUS | <i>vga</i> (A), <i>lnu</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) | <i>eta</i> |
| X103 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | ERI-CLI-TET-FUS | <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M) | - |
| X105 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | ERI-CLI-STR-TET-FUS-SXT | <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>mph</i> (C), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (M), <i>dfrD</i> , <i>dfrG</i> | - |
| X106 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | ERI-CLI-STR-TET-FUS-SXT | <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>vga</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M), <i>dfrD</i> , <i>dfrK</i> | <i>eta</i> |
| X94 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | ERI-CLI-STR-TET-FUS-SXT | <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>vga</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>dfrK</i> | - |
| X115 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | ERI-CLI-STR-TET-FUS-SXT | <i>erm</i> (C), <i>msr</i> (A), <i>mph</i> (C), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>dfrD</i> , <i>dfrG</i> | - |
| X117 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PI | A | CLI-TET-FUS | <i>lnu</i> (A), <i>tet</i> (K) | <i>eta</i> |
| X144 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PSE | A | ERI-CLI-CLO-FUS | <i>erm</i> (C), <i>mph</i> (C), <i>vga</i> (A), <i>cat</i> _{pC221} | - |
| X145 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PSE | A | ERI-CLI-CLO-FUS | <i>erm</i> (C), <i>cat</i> _{pC221} | - |
| X146 | <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> | PSE | A | ERI-CLI-CLO-FUS | <i>erm</i> (C), <i>lnu</i> (A), <i>cat</i> _{pC221} | - |
| X108 | <i>S. sciuri</i> | PI | A | PEN-ERI-CLI-STR-TET-FUS | <i>mecA</i> , <i>erm</i> (C), <i>sal</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) | - |
| X110 | <i>S. sciuri</i> | PI | A | PEN-ERI-CLI-STR-TET-FUS | <i>mecA</i> , <i>erm</i> (C), <i>sal</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (M) | - |
| X124 | <i>S. sciuri</i> | PI | P | PEN-FOX-ERI-CLI-STR-TET-FUS | <i>mecA</i> , <i>erm</i> (C), <i>lnu</i> (A), <i>sal</i> (A), <i>str</i> , <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (M) | - |

| Cepa | Especie | Granja | Origen ^a | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|------|-------------------------|--------|---------------------|--|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo de resistencia a antibióticos | Genotipo de resistencia a antibióticos | |
| X147 | <i>S. sciuri</i> | PSE | A | CLI-STR-TET-FUS-SXT | <i>lnu(A), sal(A), str, tet(K), dfrD</i> | - |
| X148 | <i>S. sciuri</i> | PSE | A | CLI-TET-FUS | <i>lnu(A), sal(A), tet(K)</i> | - |
| X150 | <i>S. sciuri</i> | PSE | A | CLI-TET-FUS | <i>vga(A), lnu(A), sal(A), tet(L)</i> | - |
| X152 | <i>S. sciuri</i> | PSE | A | CLI-STR-TET | <i>vga(A), lnu(A), lnu(B), sal(A), str, tet(K), tet(L)</i> | - |
| X154 | <i>S. sciuri</i> | PSE | A | CLI-FUS | <i>vga(A), lnu(A), sal(A)</i> | - |
| X155 | <i>S. sciuri</i> | PSE | A | CLI-TET-FUS | <i>vga(A), sal(A), tet(K), tet(L)</i> | - |
| X107 | <i>S. saprophyticus</i> | PI | A | PEN-FOX-CLI-STR-TET-SXT | <i>mecA, lnu(A), str, tet(K), tet(L), tet(M), fusD, dfrD, dfrG</i> | - |
| X119 | <i>S. saprophyticus</i> | PI | P | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-STR-TET-FUS | <i>mecA, erm(C), lnu(A), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, str, tet(K), tet(L), tet(M), fusD</i> | - |
| X121 | <i>S. saprophyticus</i> | PI | P | PEN-FOX-CLI-STR-TET-SXT | <i>mecA, blaZ, lnu(A), str, tet(K), tet(L), tet(M), fusD, dfrD, dfrG</i> | - |
| X122 | <i>S. saprophyticus</i> | PI | P | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-STR-TET | <i>mecA, erm(C), vga(A), lnu(B), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ant(4')-Ia, str, tet(M), fusD</i> | - |
| X123 | <i>S. saprophyticus</i> | PI | P | PEN-FOX-ERI-CLI-STR-TET-CLO-SXT | <i>mecA, erm(C), vga(A), lnu(A), str, tet(K), tet(L), tet(M), fexA, fusD, dfrD, dfrG</i> | - |
| X98 | <i>S. epidermidis</i> | PI | A | PEN-ERI-CLI-STR-TET | <i>blaZ, erm(C), msr(A), vga(A), lnu(A), str, tet(K), tet(M)</i> | - |
| X104 | <i>S. epidermidis</i> | PI | A | PEN-CLI-TOB-STR-TET-SXT | <i>blaZ, vga(A), ant(4')-Ia, str, tet(K), tet(L), dfrA, dfrK</i> | - |
| X160 | <i>S. epidermidis</i> | PSE | A | PEN-ERI-CLI-FUS | <i>blaZ, msr(A), mph(C), vga(A), fusB</i> | - |
| X161 | <i>S. epidermidis</i> | PSE | P | PEN-CLI | <i>blaZ, vga(A)</i> | - |
| X111 | <i>S. nepalensis</i> | PI | A | CLI-SXT | <i>vga(A), dfrD</i> | - |

| Cepa | Especie | Granja | Origen ^a | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|------|------------------------|--------|---------------------|---|---|---------------------|
| | | | | Fenotipo de resistencia a antibióticos | Genotipo de resistencia a antibióticos | |
| X112 | <i>S. nepalensis</i> | PI | A | CLI-TET-CLO-SXT | <i>vga(A), lnu(A), tet(M), fexA, dfrG</i> | - |
| X113 | <i>S. nepalensis</i> | PI | A | ERI-CLI-TET-CLO | <i>erm(C), mph(C), lnu(A), tet(M), fexA</i> | - |
| X116 | <i>S. nepalensis</i> | PI | A | ERI-CLI | <i>erm(C), lnu(A)</i> | - |
| X97 | <i>S. xylosus</i> | PI | A | CLI-GEN-TOB-STR-TET-SXT | <i>lnu(A), lnu(B), aac(6')-le-aph(2'')-la, ant(4')-la, str, tet(K), dfrD, dfrG</i> | - |
| X129 | <i>S. xylosus</i> | PSE | A | ERI-CLI-FUS | <i>erm(C), vga(A), lnu(A)</i> | - |
| X140 | <i>S. xylosus</i> | PSE | A | ERI-CLI-TET | <i>erm(C), mph(C), tet(K)</i> | - |
| X159 | <i>S. xylosus</i> | PSE | A | ERI-CLI-TET | <i>mph(C), vga(A), tet(K), tet(M)</i> | - |
| X96 | <i>S. haemolyticus</i> | PI | A | ERI-CLI-STR-TET-CIP ^b | <i>erm(C), vga(A), str, tet(K)</i> | - |
| X99 | <i>S. haemolyticus</i> | PI | A | PEN-ERI-CLI-TOB-TET-CIP ^c -CLO | <i>blaZ, erm(C), erm(T), vga(A), ant(4')-la, tet(K), tet(M), fexA</i> | - |
| X101 | <i>S. haemolyticus</i> | PI | A | PEN-FOX-ERI-CLI-GEN-TOB-STR-TET-CIP ^d -SXT | <i>mecA, blaZ, erm(C), msr(A), lnu(B), aac(6')-le-aph(2'')-la, ant(4')-la, str, tet(K), tet(L), dfrK</i> | - |
| X151 | <i>S. simulans</i> | PSE | A | CLI-STR-CLO | <i>vga(A), str, cat_{pC221}</i> | - |
| X156 | <i>S. simulans</i> | PSE | A | CLI | <i>vga(A), lnu(A)</i> | <i>lukS-F/PV</i> |
| X157 | <i>S. simulans</i> | PSE | A | CLI-STR-TET | <i>vga(A), lnu(A), str, tet(L)</i> | - |
| X149 | <i>S. chromogenes</i> | PSE | A | Sensible | - | - |
| X153 | <i>S. chromogenes</i> | PSE | A | CLI | <i>vga(A), lnu(A)</i> | - |
| X109 | <i>S. equorum</i> | PI | A | PEN-FOX-ERI-CLI-STR-TET-CLO-FFN-LZD | <i>mecA, erm(B), isa(B), str, tet(M), cat_{pC221}, cfr</i> | - |
| X120 | <i>S. lentus</i> | PI | P | ERI-CLI-GEN-TOB-STR-TET-CIP ^e -CLO-SXT | <i>erm(C), mph(C), lnu(A), aac(6')-le-aph(2'')-la, ant(4')-la, str, tet(M), cat_{pC221}, dfrD, dfrG</i> | - |

| Cepa | Especie | Granja | Origen ^a | Resistencia a antibióticos | | Genes de virulencia |
|------|--------------------|--------|---------------------|--|--|---------------------|
| | | | | Fenotipo de resistencia a antibióticos | Genotipo de resistencia a antibióticos | |
| X158 | <i>S. succinus</i> | PSE | A | PEN-TET | <i>blaZ, tet(K)</i> | - |
| X118 | <i>S. warneri</i> | PI | A | PEN | <i>blaZ</i> | - |

^aA, aire; P, tanque de purines.

^bCambio aminoacídico S80L en la proteína GrIA.

^cCambio aminoacídico D84G en la proteína GrIA.

^dCambio aminoacídico D84Y en la proteína GrIA.

^eCambio aminoacídico S84L en la proteína GyrA.

Tabla S5. Tipado del SCCmec de las 10 cepas SCoN portadoras del gen *mecA* aisladas de muestras ambientales de granjas porcinas según los dos esquemas diferentes de cebadores utilizados.

| Cepa ^a | Especie | Kondo <i>et al.</i> , 2007 | | | Zhang <i>et al.</i> , 2005 |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|--------|----------------------------|
| | | <i>ccr</i> | Complejo <i>mec</i> | SCCmec | SCCmec |
| X101 | <i>S. haemolyticus</i> | <i>ccrC</i> | A, B | - | III, V |
| X107 | <i>S. saprophyticus</i> | - | - | - | - |
| X108* | <i>S. sciuri</i> | - | - | - | V |
| X109 | <i>S. equorum</i> | <i>ccrA3-ccrB3</i> | - | - | - |
| X110* | <i>S. sciuri</i> | - | - | - | - |
| X119 | <i>S. saprophyticus</i> | - | A | - | - |
| X121 | <i>S. saprophyticus</i> | <i>ccrC</i> | - | - | - |
| X122 | <i>S. saprophyticus</i> | <i>ccrA1-ccrB1, ccrA3-ccrB3</i> | A | - | - |
| X123 | <i>S. saprophyticus</i> | <i>ccrA1-ccrB1, ccrA3-ccrB3</i> | A, C | - | - |
| X124 | <i>S. sciuri</i> | - | A, C | - | V |

^aLas cepas marcadas con un asterisco son las que no mostraron un fenotipo de resistencia a metilina.

ANEXO III. SCoP de animales de compañía con signos de infección

Tabla S6. Tipo de infección, muestra y método de muestreo usado para obtener los 33 aislados SCoP de animales de compañía con signos de infección

| Cepa | Especie | Tipo de infección ^a | Muestra | Método de muestreo |
|-------|---------|--------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| C3871 | SPRM | B-J | Hisopo muscular | Desinfección e hisopo estéril |
| C3880 | SPRM | S | Drenaje herida | Desinfección e hisopo estéril |
| C3885 | SPRM | I | Seroma | Jeringa |
| C5355 | SPRM | B-J | Hisopo articular | Jeringa |
| C5613 | SPRM | U-R | Secreción mamaria | Desinfección e hisopo estéril |
| C3866 | SPRM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C3870 | SPRM | U-R | Hisopo vaginal | Desinfección e hisopo estéril |
| C3869 | SPRM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5344 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5345 | SPSM | SI | Efusión pleural | Jeringa |
| C5360 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5347 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C3877 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5351 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C3881 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5354 | SPSM | U-R | Hisopo uretral | Desinfección e hisopo estéril |
| C5358 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C3875 | SPSM | I | Hisopo de oído | Desinfección e hisopo estéril |
| C3876 | SPSM | U-R | Hisopo vaginal | Desinfección e hisopo estéril |
| C5356 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5362 | SPSM | I | Hisopo de oído | Desinfección e hisopo estéril |
| C5353 | SPSM | U-R | Hisopo vaginal | Desinfección e hisopo estéril |
| C3873 | SPSM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C3878 | SPSM | U-R | Hisopo vaginal | Desinfección e hisopo estéril |
| C3879 | SPSM | I | Hisopo de oído | Desinfección e hisopo estéril |
| C5357 | SPSM | U-R | Hisopo vaginal | Desinfección e hisopo estéril |
| C3874 | SPSM | I | Hisopo de oído | Desinfección e hisopo estéril |
| C5359 | SPSM | U-R | Secreción amaria | Desinfección e hisopo estéril |
| C3883 | SARM | S | Fístula postquirúrgica | Desinfección e hisopo estéril |

| | | | | |
|--------------|------|-----|-----------------------|-------------------------------|
| C5612 | SASM | U-R | Secreción mamaria | Desinfección e hisopo estéril |
| C5650 | SASM | R | Biopsia nasal-maxilar | Biopsia |
| C5610 | SASM | U-R | Orina | Cistocentesis |
| C5609 | SASM | I | Hisopo absceso | Desinfección e hisopo estéril |

^aH-A, infección de huesos-articulaciones; U-R, infección urinaria o del aparato reproductor; R, infección respiratoria; T, infección del tegumento; Q, infección quirúrgica; S, infección séptica.

ANEXO IV. *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. resistentes a linezolid

Tabla S7. Características de las cepas resistentes a linezolid identificadas en esta tesis.

| Cepa | Especie | Origen | Tipado | CMI a linezolid (mg/L) | Mecanismos de resistencia a linezolid | Transferencia por conjugación |
|--------|-----------------------|-----------------------|--|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| C9026 | <i>S. aureus</i> | Clínico | t2220-ST125/CC5- <i>agrI</i> -SCC <i>mecV</i> | 16 | <i>cfr</i> (variante Tn558); L4 | + |
| X1761 | <i>S. aureus</i> | Clínico | t011-ST398/CC398- <i>agrI</i> -SCC <i>mecV</i> | 8 | <i>cfr</i> (variante Tn558) | + |
| X2063 | <i>S. aureus</i> | Infección cerdo | t034-CC398- <i>agrI</i> -SCC <i>mecV</i> | | <i>cfr</i> (variante Tn558); L4 | - |
| C9906 | <i>S. aureus</i> | Clínico | t1688-ST123- <i>agrI</i> V | 8 | <i>cfr</i> (variante Tn558, plásmido) | + |
| X109 | <i>S. equorum</i> | Aire granja de cerdos | - | 8 | <i>cfr</i> | - |
| X114 | <i>S. arlettae</i> | Aire granja de cerdos | - | 8 | <i>cfr</i> | - |
| C10354 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3 | |
| C10356 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| X466 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| C10515 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| C10040 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3 | |
| X530 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| X544 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| X548 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3 | |
| X507 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3 | |
| X316 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3 | |
| X529 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCC <i>mecIII</i> | >256 | ARNr 23S; L3 | |

| | | | | | | |
|---------------|-----------------------|---------|-------------------|------|------------------------------|-----------------------------------|
| X1758 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCCmecIII | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| X1759 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCCmecIII | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| X1760 | <i>S. epidermidis</i> | Clínico | ST2/CC5-SCCmecIII | >256 | ARNr 23S; L3; L4 | |
| X315 | <i>S. hominis</i> | Clínico | - | 32 | ARNr 23S | |
| C9884 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST585/CC4 | 12 | <i>optrA</i> | + |
| C8946 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST480 | 16 | <i>optrA</i> | - |
| C9901 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST21/CC21 | 12 | <i>optrA</i> | + |
| C9951 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST16 | 8 | <i>optrA</i> ; ARNr 23S | + |
| C9952 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST35 | 8 | <i>optrA</i> | + |
| C9736 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST585/CC4 | 16 | <i>optrA</i> | + |
| C9737 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST896 | 16 | <i>optrA</i> | + |
| X523 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST480 | 8 | <i>optrA</i> ; L4 | + |
| X524 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST480 | 8 | <i>optrA</i> ; L4 | + |
| X525 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST585/CC4 | 8 | <i>optrA</i> | + |
| X526 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST896 | 4 | <i>optrA</i> | + |
| X527 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST6/CC2 | 16 | <i>optrA</i> | + |
| X528 | <i>E. faecalis</i> | Clínico | ST480 | 12 | <i>optrA</i> ; <i>cfr(D)</i> | <i>optrA</i> + <i>cfr(D)</i> - |
| C9902 | <i>E. faecium</i> | Clínico | ST17/CC17 | 8 | ARNr 23S; L22 | |
| C9903 | <i>E. faecium</i> | Clínico | ST262/CC17 | 16 | ARNr 23S | |
| C10262 | <i>E. faecium</i> | Clínico | ST117/CC17 | 32 | ARNr 23S | |
| C9950 | <i>E. faecium</i> | Clínico | ST117/CC17 | 4 | ARNr 23S | |

| | | | | | | |
|---------------|-------------------|-----------------------|------------|----|----------------------------|---------------------------------|
| C9953 | <i>E. faecium</i> | Clinico | ST117/CC17 | 12 | ARNr 23S | |
| C10269 | <i>E. faecium</i> | Clinico | ST117/CC17 | 12 | ARNr 23S; L22 | |
| C10004 | <i>E. faecium</i> | Aire granja de cerdos | ST128 | 8 | <i>optrA</i> ; <i>poxA</i> | <i>optrA</i> - <i>poxA</i> + |
| C10009 | <i>E. faecium</i> | Aire granja de cerdos | ST437 | 8 | <i>optrA</i> ; <i>poxA</i> | <i>optrA</i> - <i>poxA</i> + |

ANEXO V. Secuencias depositadas en el GenBank

Tabla S8. Números de acceso y características de las secuencias nucleotídicas depositadas en el GenBank.

| Número de acceso Genbank | Cepa | Tamaño (pb) | Descripción |
|--------------------------|----------------------------------|-------------|---------------------------------------|
| MN642001 | <i>S. equorum</i> X109 | 34057 | Entorno genético del gen <i>cfr</i> |
| MN637835 | <i>S. arlettae</i> X114 | 30178 | Entorno genético del gen <i>cfr</i> |
| MT252966 | <i>S. pseudintermedius</i> C5347 | 5069 | Entorno genético del gen <i>dfrK</i> |
| MN661250 | <i>E. faecium</i> C10009 | 8281 | Entorno genético del gen <i>poxtA</i> |
| MN848142 | <i>E. faecalis</i> C9901 | 21530 | Entorno genético del gen <i>optrA</i> |
| MN731744 | <i>E. faecalis</i> C9952 | 12731 | Entorno genético del gen <i>optrA</i> |
| MN731743 | <i>E. faecalis</i> X526 | 11227 | Entorno genético del gen <i>optrA</i> |

ANEXO VI. Publicaciones derivadas de esta tesis

- Ruiz-Ripa, L., Gómez, P., Alonso, C.A., Camacho, M.C., de la Puente, J., Fernández-Fernández, R., Ramiro, Y., Quevedo, M.A., Blanco, J.M., Zarazaga, M., Höfle, U., Torres, C., 2019.** Detection of MRSA of Lineages CC130-*mecC* and CC398-*mecA* and *Staphylococcus delphini-lnu(A)* in Magpies and Cinereous Vultures in Spain. *Microb. Ecol.* 78, 409–415. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01328-4>
- Ruiz-Ripa, L., Gómez, P., Alonso, C.A., Ramiro, Y., De la Puente, J., Fernández-Fernández, R., Quevedo, M.Á., Blanco, J.M., Gerardo, B., Zarazaga, M., Höfle, U., Torres, C., 2020.** Frequency and Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Coagulase-Negative Staphylococci from Wild Birds in Spain. Detection of *tst*-Carrying *S. sciuri* Isolates. *Microorganisms* 8, 1–12.
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Mama, O.M., Eichhorn, I., Schwarz, S., Torres, C., 2020.** Coagulase-negative staphylococci carrying *cfr* and PVL genes, and MRSA/MSSA-CC398 in the swine farm environment. *Vet. Microbiol.* 243, 108631. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108631>
- Ruiz-Ripa, L., Bellés, A., García, M., Torres, C., 2020.** Detection of a *cfr*-positive MRSA CC398 strain in a pig farmer in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.03.006>
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Eichhorn, I., Azcona-Gutierrez, J.M., Alonso, C.A., Perez-Moreno, M.O., Aspiroz, C., Bellés, A., Schwarz, S., Torres, C., 2020.** Mechanisms of Linezolid Resistance Among Clinical *Staphylococcus* spp. in Spain: Spread of Methicillin- and Linezolid-Resistant *S. epidermidis* ST2. *Microb. Drug Resist.* <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0122>
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Eichhorn, I., Schwarz, S., Torres, C., 2019.** Detection of *poxA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 22, 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.012>
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Eichhorn, I., Azcona-Gutiérrez, M., Pérez-Moreno, M.O., Seral, C., Aspiroz, C., Alonso, C.A., Torres, L., Alós, J.I., Schwarz, S., Torres, C., 2020.** Mechanisms of Linezolid Resistance Among Enterococci of Clinical Origin in Spain — Detection of *optrA*- and *cfr(D)*-Carrying *E. faecalis*. *Microorganisms* 8, 1155. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081155>
- Ruiz-Ripa, L., Simón, C., Ceballos, S., Ortega, C., Zarazaga, M., Torres, C., Gómez-Sanz, E.** Staphylococcal lineages with transmission ability circulate as causative agents of infections in pets for years. *BMC Vet. Microb.* En avanzado estado de revisión.



Detection of MRSA of Lineages CC130-*mecC* and CC398-*mecA* and *Staphylococcus delphini*-*lnu(A)* in Magpies and Cinereous Vultures in Spain

Laura Ruiz-Ripa¹ · Paula Gómez¹ · Carla Andrea Alonso¹ · Maria Cruz Camacho² · Javier de la Puente^{3,4} · Rosa Fernández-Fernández¹ · Yolanda Ramiro² · Miguel Angel Quevedo⁵ · Juan Manuel Blanco⁶ · Myriam Zarazaga¹ · Ursula Höfle² · Carmen Torres¹

Received: 22 August 2018 / Accepted: 15 January 2019 / Published online: 29 January 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The aim of this study was to determine the carriage rate of coagulase-positive staphylococci (CoPS) in wild birds and to characterize recovered isolates. Tracheal samples from 324 wild birds, obtained in different Spanish regions during 2015–2016, were screened for CoPS carriage. The antimicrobial resistance profile and the virulence gene content were investigated. Molecular typing was performed by *spa*, *agr*, MLST, *SCCmec*, and *S. delphini* group classification. CoPS were recovered from 26 samples of wild birds (8.3%), and 27 isolates were further characterized. Two CoPS species were detected: *S. aureus* ($n = 15$; eight cinereous vultures and seven magpies) and *S. delphini* ($n = 12$; 11 cinereous vultures and one red kite). Thirteen *S. aureus* were methicillin-resistant (MRSA) and the remaining two strains were methicillin-susceptible (MSSA). Twelve MRSA were *mecC*-positive, typed as t843-ST1583/ST1945/ST1581/ST1571 ($n = 11$) and t1535-ST1945 ($n = 1$) (all of clonal-complex CC130); they were susceptible to the non- β -lactams tested. The remaining MRSA strain carried the *mecA* gene, was typed as t011-ST398-CC398-*agrI*-*SCCmec*-V, and showed a multiresistance phenotype. MSSA isolates were ascribed to lineages ST97-CC97 and ST425-CC425. All *S. aureus* lacked the studied virulence genes (*lukS/F*-PV, *tst*, *eta*, *etb*, and *etd*), and the IEC type E (with *scn* and *sak* genes) was detected in four *mecC*-positive and one MSSA isolates. *S. delphini* strains were methicillin-susceptible but showed resistance to at least one of the antimicrobials tested, with high penicillin (75%, with *blaZ* gene) and tetracycline [58%, with *tet(K)*±*tet(L)*] resistance rates. All *S. delphini* isolates presented the virulence genes *lukS*-I, *siet*, and *se-int*, and four carried the clindamycin-resistance *lnu(A)* gene.

Keywords Wild birds · CoPS · *S. aureus* · *mecC*-MRSA · *mecA*-MRSA · *S. delphini*

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00248-019-01328-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Carmen Torres
carmen.torres@unirioja.es

- ¹ Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain
- ² Grupo SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ciudad Real, Spain
- ³ SEO/BirdLife, Bird Monitoring Unit, Madrid, Spain
- ⁴ Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, Rascafría, Madrid, Spain
- ⁵ Zoobotánico Jerez, Jerez de la Frontera, Spain
- ⁶ Aquila Foundation, Oropesa, Spain

Introduction

One of the most important public health problems is the alarming increase of antimicrobial resistance and the wide spread of antimicrobial resistant bacteria. In this regard, *Staphylococcus* is one of the most significant genera of which, more than 50 species have been described thus far, distinguished in two major groups by their ability to produce coagulase: coagulase-positive (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS) [1]. CoPS species include *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, and coagulase-variable *S. hyicus* and *S. agnetis*. *Staphylococcus* spp. normally colonize the skin and mucous membranes of both humans and animals, and some species are also considered as important opportunistic



Article

Frequency and Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Coagulase-Negative Staphylococci from Wild Birds in Spain. Detection of *tst*-Carrying *S. sciuri* Isolates

Laura Ruiz-Ripa¹, Paula Gómez¹, Carla Andrea Alonso² , María Cruz Camacho³, Yolanda Ramiro³, Javier de la Puente^{4,5}, Rosa Fernández-Fernández¹, Miguel Ángel Quevedo⁶, Juan Manuel Blanco⁷, Gerardo Báguena⁸, Myriam Zarazaga¹, Ursula Höfle³ and Carmen Torres^{1,*}

¹ Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain; laura_ruiz_10@hotmail.com (L.R.-R.); paula_gv83@hotmail.com (P.G.); rosa.fernandez.1995@gmail.com (R.F.-F.); myriam.zarazaga@unirioja.es (M.Z.)

² Servicio de Microbiología, Hospital San Pedro, 26006 Logroño, Spain; caalonso@riojasalud.es

³ Grupo SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), 13005 Ciudad Real, Spain; mcruzcresco@gmail.com (M.C.C.); faunicalatina.vet@gmail.com (Y.R.); ursula.hofle@uclm.es (U.H.)

⁴ SEO/BirdLife, Citizen Science Unit, 28053 Madrid, Spain; jdelapuerta@seo.org

⁵ Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación, 28740 Rascafría, Spain

⁶ Zoobotánico Jerez, 11408 Jerez de la Frontera, Spain; miguel.quevedo@aytojerez.es

⁷ Aquila Foundation, 45567 Oropesa, Spain; aquila.foundation@hotmail.com

⁸ Fundación para la Conservación del Quebrantahuesos, 50001 Zaragoza, Spain; gerardo@quebrantahuesos.org

* Correspondence: carmen.torres@unirioja.es; Tel.: +34-941299750

Received: 4 August 2020; Accepted: 26 August 2020; Published: 29 August 2020



Abstract: The objective of this study was to determine the prevalence and diversity of coagulase-negative staphylococci (CoNS) species from wild birds in Spain, as well as to analyze the antimicrobial resistance phenotype/genotype and the virulence gene content. During 2015–2016, tracheal samples of 242 wild birds were collected in different regions of Spain for staphylococci recovery. The species identification was performed using MALDI-TOF. The antimicrobial resistance phenotype and genotype was investigated by the disk diffusion method and by PCR, respectively. The presence of the virulence genes *lukF/S-PV*, *tst*, *eta*, *etb*, *etd* and *scn* was investigated by PCR. Moreover, CoNS carrying the *mecA* gene were subjected to SCC_{mec} typing. Of the tested animals, 60% were CoNS-carriers, and 173 CoNS isolates were recovered from the 146 positive animals, which belonged to 11 species, with predominance of *S. sciuri* ($n = 118$) and *S. lentus* ($n = 25$). A total of 34% of CoNS isolates showed a multidrug resistance phenotype, and 42 *mecA*-positive methicillin-resistant CoNS (MRCoNS) were detected. The isolates showed resistance to the following antimicrobials (percentage of resistant isolates/antimicrobial resistance genes detected): penicillin (49/ *blaZ*, *mecA*), cefoxitin (24/ *mecA*), erythromycin and/or clindamycin (92/ *erm*(B), *erm*(C), *erm*(43), *msr*(A), *mph*(C), *lnu*(A), *lsa*(B), *vga*(A) and *sal*(A)), gentamicin and/or tobramycin (5/ *aac*(6′)-Ie-*aph*(2′′)-Ia, *ant*(4′)-Ia), streptomycin (12/*str*), tetracycline (17/ *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M)), ciprofloxacin (4), chloramphenicol (1/ *fexA*), fusidic acid (86/ *fusB*, *fusD*) and trimethoprim–sulfamethoxazole (1/ *dfrK*). None of the isolates harbored the *lukF/S-PV*, *eta*, *etb*, *etd* and *scn* genes, but two *S. sciuri* isolates (1%) carried the *tst* gene. Wild birds are frequently colonized by CoNS species, especially *S. sciuri*. We identified scavenging on intensively produced livestock and feeding on landfills as risk factors for CoNS carriage. High proportions of

MRCoNS and multidrug resistant CoNS were detected, which coupled with the presence of important virulence genes is of concern.

Keywords: coagulase-negative staphylococci; CoNS; MRCoNS; wild birds; *tst*; *S. sciuri*; *S. lentus*; antibiotic resistance; reservoir

1. Introduction

Staphylococci can be divided in two major groups based on their capacity to produce the enzyme coagulase and, hence, their ability to clot the blood plasma: coagulase-positive (CoPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS). CoNS constitute a very heterogeneous group that comprise over 40 commensal species of the mucous membranes and skin of humans and other animals, especially mammals and birds [1–4]. However, in the last decade, CoNS have also been recognized as important causative agents of nosocomial infections, especially the species *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* and *S. lugdunensis* [3,4]. Moreover, CoNS can also cause disease in animals [1,5], including dermatitis and endocarditis in poultry [6,7].

Methicillin-resistant CoNS (MRCoNS), mostly mediated by the *mecA* gene, have gained interest in recent years because of their implications in human and veterinary medicine [8]. Besides methicillin resistance, CoNS have been postulated as an important reservoir of antimicrobial resistance genes that are often located on mobile genetic elements, and, therefore, could be transferred to more pathogenic bacteria, such as *S. aureus*, by horizontal gene transfer [3,4,9,10]. In fact, the CoNS belonging to the *Staphylococcus sciuri* group, which includes *S. sciuri*, *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. vitulinus* and *S. stepanovicii*, are especially relevant because of their role in the origin, evolution and spread of the *mecA* gene [4,11]. Regarding the pathogenicity of CoNS, former studies have reported major virulence factors of *S. aureus* (e.g., Panton–Valentine leukocidin, toxic shock syndrome toxin and exfoliative toxins) in CoNS recovered from humans, livestock and the livestock environment, although their detection is still highly unusual [1,2,12,13].

Several studies have investigated the molecular characteristics of CoNS isolated from food items, companion animals, livestock and clinical samples [1,5,8,13–17], but CoNS from wildlife remains largely unattended. In this regard, birds have been postulated as sentinels, reservoirs and potential disseminators of antimicrobial resistance due to their interaction with the human interface, their diverse ecological niches and their capacity to migrate long distances [18]. Thus, the objective of the present study was to evaluate the prevalence and diversity of CoNS species in wild birds, to determine their antimicrobial susceptibility pattern and to analyze their virulence gene content.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

From May 2015 to July 2016, the tracheal samples of 242 healthy wild birds [cinereous vulture (*Aegypius monachus*), 98; magpie (*Pica pica*), 59; red kite (*Milvus milvus*), 38; northern bald ibis (*Geronticus eremita*), 27; bearded vulture (*Gypaetus barbatus*), 9; black-headed gull (*Chroicocephalus ridibundus*), 6; Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*), 2; European honey buzzard (*Pernis apivorus*), 2; and western marsh harrier (*Circus aeruginosus*), 1] were collected in different regions of northern (Huesca), central (Ciudad Real, Madrid, Valencia and Castellón) and southern (Cádiz) Spain.

Most of the species sampled are obligate scavengers (bearded vulture, Egyptian vulture and cinereous vulture) or facultative scavengers that primarily feed on carrion (red kite). Magpies, black-headed gulls and western marsh harriers are occasional scavengers, while honey buzzards and northern bald ibis feed primarily on insects (wasps in particular in honey buzzards). All samples, except magpies and black-headed gulls, were obtained as part of conservation programs, either during

banding or radio-tagging of chicks in the nest (cinereous vulture, Egyptian vulture, honey buzzard, northern bald ibis and bearded vulture), pre-reintroduction health checks of captive raised chicks (northern bald ibis and bearded vulture), or adults captured at vulture restaurants for banding and radio-tagging (red kites, bearded vultures and western marsh harrier). Magpies were collected from hunting estates after capture and euthanasia as part of authorized control programs, and black-headed gulls were juveniles dead from trauma in a thunderstorm collected near a landfill.

Chicks were sampled at the end of the breeding season, between May and July, specifically: bearded vulture, June 2015 and June 2016; cinereous vultures, June–July 2015 and June–July 2016; northern bald ibis, June 2016; Egyptian vulture, July 2016; and honey buzzard, July 2016. Black-headed gulls were collected in May 2015, and magpies were captured in May–July 2015 and May–July 2016. Two adult bearded vultures were captured for transmitter exchange at a vulture restaurant in November 2015, and migratory or wintering red kites and the western marsh harrier were captured at a different vulture restaurant during the time of Southbound migration/arrival of wintering birds in November 2015 and during spring migration in February 2016.

None of the birds was specifically captured for the purpose of the present study and capture and handling of the birds was authorized in each case by permits from the regional government. Handling and sampling were carried out following all applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and ethical use of animals, specifically directive 2010/63/EU and Spanish laws 9/2003 and 32/2007, and Royal decrees 178/2004, 1201/2005 and RD53/2013.

All samples were maintained at 4 °C until arrival at the laboratory and frozen at –80 °C until further analysis. These samples were tested in parallel for the presence of CoPS [19] and also for CoNS; this last one in the present study. In the previous work, CoPS were recovered from 20 of the 242 samples analyzed (8.3%) and they were identified as *S. aureus* ($n = 9$) and *S. delphini* ($n = 12$) [19].

2.2. Bacterial Isolation and Identification

The tracheal swab samples were inoculated into brain heart infusion (BHI; Condalab, Madrid, Spain) broth supplemented with 6.5% NaCl and incubated for 24 h at 37 °C. An aliquot of 30 µL was seeded on mannitol salt agar (MSA; Condalab, Madrid, Spain) and oxacillin resistance screening agar base (ORSAB; Oxoid, Hampshire, UK) with 2 mg/L oxacillin and incubated for 24 h at 37 °C, for CoNS and MRCoNS recovery. A maximum of five mannitol non-fermenting colonies per sample were selected and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF; Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using the standard extraction protocol recommended by Bruker [20]. Isolates belonging to different CoNS species of each sample were further studied.

2.3. Antimicrobial Resistance Phenotype and Genotype

The susceptibility to 13 antimicrobial agents was tested by the disk diffusion method. The antimicrobial agents tested were as follows (µg/disk): penicillin (10 units), cefoxitin (30), erythromycin (15), clindamycin (2), gentamicin (10), tobramycin (10), streptomycin (10), tetracycline (30), ciprofloxacin (5), chloramphenicol (30), linezolid (30), fusidic acid (10) and trimethoprim–sulfamethoxazole (1.25 + 23.75). The disk diffusion results for all antimicrobial agents were interpreted using the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) zone diameter breakpoints for CoNS [21] when available, with the exception of streptomycin [22]. As *S. sciuri* is intrinsically resistant to clindamycin, this resistance was not taken into account when considering the isolate as multiresistant [23].

The presence of the following resistance genes was tested by single PCRs: *blaZ*, *mecA*, *mecB*, *mecC*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(T)*, *erm(43)*, *msr(A)*, *mph(C)*, *sal(A)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *lsa(B)*, *vga(A)*, *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia*, *ant(4′)-Ia*, *str*, *ant(6)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(K)*, *fex(A)*, *fex(B)*, *cat_{pC194}*, *cat_{pC221}*, *cat_{pC223}*, *cfr*, *cfr(B)*, *cfr(D)*, *optrA*, *poxtA*, *fusB*, *fusC*, *fusD*, *dfrA*, *dfrD*, *dfrG* and *dfrK* (Table S1). The physical linkage of *tet(L)-dfrK* was investigated by PCR (Table S1). Positive controls from the collection of the Universidad de La Rioja were included in all PCR assays. In addition, mutations leading to amino

acid changes in the GyrA and GrlA proteins were investigated in ciprofloxacin-resistant isolates by PCR and amplicon sequencing (Table S1). The respective sequences of *S. lentus* strain NCTC12102 (GenBank accession number UHDR01000002), *S. sciuri* strain NCTC12103 (GenBank accession number LS483305) and *S. xylosum* strain NCTC11043 (GenBank accession number UHEI01000002) were used as reference for the amino acid changes detection.

2.4. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Characterization

All CoNS isolates carrying the *mecA* gene were subjected to SCC*mec* typing by multiplex PCRs targeting the *ccr* gene complex and the *mec* gene complex, as previously described [24] (Table S1).

2.5. Virulence Gene Content

The presence of the genes encoding the virulence determinants Pantone–Valentine leukocidin (*lukF/S-PV*), toxic shock syndrome toxin 1 (*tst*), and the exfoliative toxins A (*eta*), B (*etb*) and D (*etd*) was studied by single PCRs and confirmed by amplicon sequencing (Table S1). Moreover, the presence of the *scn* gene, the marker of the human immune evasion cluster (IEC), was investigated in all CoNS isolates (Table S1). Positive controls from the collection of the Universidad de La Rioja were included in all PCR assays.

2.6. Statistical Analysis

Pearson's chi-square test was used to explore colonization of the tested birds by *S. sciuri* and *S. lentus*. Specifically, we compared the carriage of *S. sciuri* and *S. lentus* between obligate or facultative scavengers and species less likely to feed on carrion (especially livestock carrion), and in the case of *S. lentus* carriage, in red kites captured during and on spring (return) migration (February 2016, $n = 25$) and kites arriving at the vulture restaurant on Southbound migration (November 2015, $n = 13$). Analyses were carried out using SPSS statistical software version 24.0 (IBM®, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Occurrence of CoNS and Species Identification

In this study, 146 out of 242 (60.3%) tested wild birds were colonized by, at least, one species of CoNS (Table 1). Among the 146 positive birds, one single CoNS species was detected in 120 of them. Co-carriage of two different species was identified in 24 animals, and co-carriage of three and four different species was detected in 1 animal each. The following patterns of co-carriage of CoNS species were detected among the positive birds (number of animals/animal's species): *S. sciuri/S. lentus* (12/red kite), *S. sciuri/S. fleurettii* (5/cinereous vulture), *S. sciuri/S. xylosum* (2/cinereous vulture), *S. sciuri/S. kloosii* (2/cinereous vulture and European honey buzzard), *S. epidermidis/S. capitis* (1/magpie), *S. sciuri/S. epidermidis* (1/northern bald ibis), *S. saprophyticus/S. kloosii* (1/European honey buzzard), *S. sciuri/S. fleurettii/S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (1/bearded vulture), and *S. sciuri/S. lentus/S. vitulinus/S. xylosum* (1/western marsh harrier).

Table 1. Number of animals sampled, and diversity of coagulase-negative staphylococci (CoNS) species detected among wild birds.

| Animal Species | Number of Animals Sampled | Number of Animals Carrying CoNS (%) | Number of Isolates Recovered | Number of Isolates | | | | | |
|------------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | | | | <i>Staphylococcus sciuri</i> | <i>Staphylococcus lentus</i> | <i>Staphylococcus fleurettii</i> | <i>Staphylococcus vitulinus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Other CoNS Species ¹ |
| Cinereous vulture | 98 | 67 (68) | 73 | 55 | 6 | 6 | 1 | - | 5 |
| Magpie | 59 | 23 (39) | 24 | 16 | - | - | 4 | 2 | 2 |
| Red kite | 38 | 30 (79) | 42 | 25 | 17 | - | - | - | - |
| Northern bald ibis | 27 | 11 (41) | 12 | 11 | - | - | - | 1 | - |
| Bearded vulture | 9 | 5 (56) | 7 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | 2 |
| Black-headed gull | 6 | 5 (83) | 5 | 5 | - | - | - | - | - |
| Egyptian vulture | 2 | 2 (100) | 2 | 2 | - | - | - | - | - |
| European honey Buzzard | 2 | 2 (100) | 4 | 1 | - | - | - | - | 3 |
| Western marsh Harrier | 1 | 1 (100) | 4 | 1 | 1 | . | 1 | - | 1 |
| Total | 242 | 146 (60) | 173 | 118 | 25 | 7 | 6 | 4 | 13 |

¹ This includes *S. xylosus*, *S. kloosii*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* and *S. capitis*.

In total, 173 CoNS isolates were recovered, and the MALDI-TOF results revealed the presence of 11 different species (number of isolates recovered/ percentage in relation to the total isolates): *S. sciuri* (118/68.2), *S. lentus* (25/14.5), *S. fleurettii* (7/4), *S. vitulinus* (6/3.5), *S. epidermidis* (4/2.3), *S. kloosii* (3/1.7), *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* (3/1.7), *S. xyloso* (3/1.7), *S. saprophyticus* (2/1.2), *S. succinus* (1/0.6) and *S. capitis* (1/0.6) (Table 1). While *S. sciuri* was present in all species, it was detected significantly more frequently in obligate and facultative scavengers (Pearson's $\chi^2 = 11.34$, D.f. = 1, $p = 0.001$, Table 1). In addition, *S. lentus* was only detected in obligate or frequent scavengers and in the harrier that had been captured on the vulture restaurant. Red kites captured on return migration (February 2016) were colonized significantly more frequently by *S. lentus* than those captured on Southbound migration/arrival at the vulture restaurant (November 2015, Pearson's $\chi^2 = 6.89$, D.f. = 1, $p = 0.0087$).

3.2. Antimicrobial Resistance Phenotype and Genotype

Table 2 shows the antimicrobial resistance rates detected among the 173 CoNS recovered from wild birds. The single isolate that showed susceptibility to all the antimicrobial agents evaluated was the *S. capitis* isolate. Fifty-eight (34%) multidrug-resistant (MDR) isolates (resistant to at least three different classes of antimicrobial agents) were detected: *S. sciuri* ($n = 21$), *S. lentus* ($n = 20$), *S. fleurettii* ($n = 6$), *S. epidermidis* ($n = 4$), *S. schleiferi* ($n = 3$), *S. xyloso* ($n = 2$), *S. kloosii* ($n = 1$) and *S. vitulinus* ($n = 1$).

Table 2. Antimicrobial resistance rates detected among the CoNS isolates recovered from wild birds.

| Antimicrobial Resistance for: | PEN | FOX | ERY | CLI | GEN | TOB | STR | TET | CIP | CHL | FUS | SXT |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Percentage of resistant isolates | 49 | 24 | 16 | 92 | 3 | 5 | 12 | 17 | 4 | 1 | 86 | 1 |

PEN, penicillin; FOX, cefoxitin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; FUS, fusidic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

Table 3 summarizes the antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of CoNS, while the specific characterization of each isolate recovered in this study can be found in the Supplementary Table S2. Forty-two *mecA*-carrying MRCoNS isolates (24%) were detected: *S. sciuri* ($n = 28$), *S. lentus* ($n = 5$), *S. fleurettii* ($n = 5$), *S. vitulinus* ($n = 2$) and *S. epidermidis* ($n = 2$). Moreover, five isolates belonging to the species *S. sciuri* or *S. fleurettii* also carried the *mecA* gene but did not show a methicillin resistance phenotype (Table 3). Eighty-five CoNS showed penicillin resistance that was mediated by the *mecA* and/or the *blaZ* genes in 59 of them. However, the mechanism of penicillin resistance could not be identified in the remaining isolates. Macrolide and/or lincosamide resistance was mediated by different combinations of *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(43)*, *msr(A)*, *mph(C)*, *lnu(A)*, *lsa(B)*, *vga(A)* and *sal(A)* resistance genes. The *sal(A)* gene was solely found among the *S. sciuri* isolates. The *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia, *ant(4')-Ia* and/or *str* genes were detected among the aminoglycoside-resistant isolates. Tetracycline resistance, which was especially high among the *S. lentus* isolates (60%), was mediated by the *tet(K)*, *tet(L)* and/or *tet(M)* genes. The analysis of the PCR-amplicon sequencing results revealed the presence of amino acid changes in the GyrA (S84L) and GrlA (D84E and M89L) proteins in five ciprofloxacin-resistant *S. lentus* isolates. Moreover, one *S. sciuri* isolate and one *S. xyloso* isolates were ciprofloxacin-resistant, but no amino acid changes were detected. The *fexA* gene was found in the two *S. sciuri* isolates that showed chloramphenicol resistance. Although only one out of the two *S. saprophyticus* isolates presented phenotypic resistance to fusidic acid, both isolates harbored the *fusD* gene, which is only detected in this species and has been reported to confer intrinsic resistance. The mechanisms implicated in the fusidic acid resistance in the remaining isolates were only identified in one *S. epidermidis* that harbored the *fusB* gene. The *dfrK* gene was identified in the single trimethoprim-resistant isolate detected (Table 3), and the PCR and amplicon sequencing results revealed that it was linked to the *tet(L)* gene. All CoNS exhibited linezolid susceptibility.

Table 3. Antimicrobial resistance phenotype and genotype and virulence gene content in the CoNS recovered from wild birds.

| Species | Number of Isolates | Antimicrobial Resistance Phenotype ^{1,2} | Antimicrobial Resistance Genotype ² | Virulence Gene Content |
|---|--------------------|---|--|-------------------------|
| <i>S. sciuri</i> | 118 | PEN ⁵⁶ -FOX ²⁸ -ERY ¹¹ -CLI-GEN ³ -TOB ⁶ -STR ⁹ -TET ⁸ -CIP ¹ -CHL ² -FUS ¹⁰⁸ | <i>mecA</i> ³¹ , <i>blaZ</i> ⁷ , <i>erm(B)</i> ⁵ , <i>erm(C)</i> ⁸ , <i>msr(A)</i> ¹ , <i>lnu(A)</i> ²⁰ , <i>lsa(B)</i> ¹ , <i>sal(A)</i> , <i>aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> ³ , <i>ant(4′)-Ia</i> ³ , <i>str</i> ⁹ , <i>tet(K)</i> ⁶ , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>tet(M)</i> ² , <i>fexA</i> ² | <i>tst</i> ² |
| <i>S. lentus</i> | 25 | PEN ⁷ -FOX ⁵ -ERY ¹³ -CLI ²⁴ -TOB ¹ -STR ³ -TET ¹⁵ -CIP ⁵ -FUS ²¹ -SXT ¹ | <i>mecA</i> ⁵ , <i>blaZ</i> ³ , <i>erm(B)</i> ⁹ , <i>erm(C)</i> ⁴ , <i>erm(43)</i> ⁷ , <i>mph(C)</i> ¹⁰ , <i>lnu(A)</i> ¹² , <i>vga(A)</i> ² , <i>lsa(B)</i> ¹ , <i>ant(4′)-Ia</i> ¹ , <i>str</i> ³ , <i>tet(K)</i> ¹¹ , <i>tet(L)</i> ¹ , <i>tet(M)</i> ⁵ , <i>dfrK</i> ¹ | |
| <i>S. fleurettii</i> | 7 | PEN-FOX ⁵ -CLI ⁶ -STR ³ -FUS | <i>mecA</i> , <i>lnu(A)</i> ¹ , <i>str</i> ³ | |
| <i>S. vitulinus</i> | 6 | PEN ² -FOX ² -CLI ² -GEN ¹ -TOB ¹ -STR ² -FUS ⁵ | <i>mecA</i> ² , <i>aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> ¹ , <i>str</i> ² | |
| <i>S. epidermidis</i> | 4 | PEN-FOX ² -ERY ³ -CLI-TET ¹ -FUS ² | <i>mecA</i> ² , <i>blaZ</i> ³ , <i>erm(C)</i> ³ , <i>mph(C)</i> ² , <i>lnu(A)</i> ³ , <i>vga(A)</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ¹ , <i>fusB</i> ¹ | |
| <i>S. kloosii</i> | 3 | PEN-CLI ¹ -TET ¹ -FUS | <i>blaZ</i> , <i>lnu(A)</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ¹ | |
| <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> | 3 | PEN ¹ -CLI ² -STR-TET | <i>blaZ</i> ¹ , <i>lnu(A)</i> ² , <i>str</i> , <i>tet(K)</i> | |
| <i>S. xylosus</i> | 3 | PEN-ERY ¹ -CLI ² -STR ¹ -TET ¹ -CIP ¹ -FUS ² | <i>blaZ</i> ¹ , <i>erm(B)</i> ¹ , <i>mph(C)</i> ¹ , <i>lnu(A)</i> ¹ , <i>str</i> ¹ , <i>tet(K)</i> ¹ | |
| <i>S. saprophyticus</i> | 2 | PEN ¹ -GEN ¹ -TOB ¹ -FUS ¹ | <i>blaZ</i> ¹ , <i>aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> ¹ , <i>fusD</i> | |
| <i>S. capitis</i> | 1 | Susceptible | - | |
| <i>S. succinus</i> | 1 | PEN | <i>blaZ</i> | |

¹ PEN, penicillin; FOX, cefoxitin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; FUS, fusidic acid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.² The superscripts indicate the number of isolates when not all isolates of the group have the same characteristic.

3.3. Virulence Gene Content

None of the isolates carried the *lukS/F-PV*, *eta*, *etb*, *etd* or *scn* genes. Interestingly, two *S. sciuri* isolates recovered from cinereous vultures carried the *tst* gene (Table 3).

3.4. SCCmec Typing

Among the 47 *mecA*-positive CoNS isolates, ten *S. sciuri* and two *S. lentus* isolates were typed as SCCmec-III and one *S. epidermidis* as SCCmec-IV. No consensus for the SCCmec type was determined for the remaining *mecA*-carrying CoNS, either because they were not ascribed to a previously known SCCmec type, or because they were non-typeable with the primers used (Table S3).

4. Discussion

The current work represents the largest study characterizing CoNS recovered from healthy free-ranging birds, and provides novel information about the frequency, diversity of species, antimicrobial resistance phenotype/genotype and the virulence profile among CoNS from wild animals.

The CoNS tracheal carriage rate detected in wild birds (60%) was higher than that detected in a previous study conducted among wild boars in Spain (37.7%) [25], but similar to that among birds of prey in Portugal (75%) [26]. These results suggest that birds (or at least those consuming vertebrate or

invertebrate prey) are more frequently colonized by CoNS than mammals; however, further studies in other animal species need to be assessed to corroborate these data. In this study, a high diversity of CoNS species was detected, *S. sciuri* being the predominant one accounting for nearly 70% of the isolates recovered. This was to be expected since this species is known to have a broad host range and is adapted to very different habitats [4,8,12,27]. Moreover, although it has been formerly found causing infections in animals [15], *S. sciuri* is the most common CoNS species colonizing healthy wild animals, including birds [25,26]. *S. lentus* was the second species most frequently recovered in this study and was especially prevalent among red kites. This staphylococcal species is commonly detected among farm animals and people with professional exposure to livestock [16,28,29]. More frequent colonization of obligate and frequent scavengers by *S. sciuri* and *S. lentus* suggests that despite being respiratory tract colonizers, carrion feeding may increase the exposure. In particular, carriage of *S. lentus* by red kites was higher in February than in November when kites arriving from breeding grounds in northern and central Europe were captured. Both the difference in prevalence and the high rate of tetracycline resistance detected in this staphylococcal species provide circumstantial evidences that *S. lentus* may be acquired from livestock carrion, particularly from slaughterhouse remains (pork) and deceased chickens from commercial layer and broiler farms that are employed as food at the vulture restaurant where the birds were captured. The species *S. xylosus* and *S. kloosii* were also recovered from birds of prey in Portugal [26]. Other CoNS species that are frequently detected as causative agents of diverse diseases in humans, such as *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. succinus* and *S. capitis* [4], were also found among healthy wild birds at very low rates.

The antimicrobial resistance rates detected for some antimicrobials among the isolates investigated are of great concern, especially because wild birds are not supposed to be under the selective pressure of antimicrobial agents; this contrasts with the high susceptibility rates detected among CoNS from wild boars in a previous Spanish study [25]. In our work, 24% of the CoNS isolates showed methicillin resistance, which is far higher than the rate observed in mammals (2.5%) and in birds of prey (0%) [25,26]. Methicillin resistance was mediated in all cases by the *mecA* gene, which was not surprising, as *mecC*-carrying MRCoNS isolates are still scarce [30], and, as far as we know, the *mecB* gene has not been previously reported in CoNS species. However, in the previous study that characterized the CoPS isolates of these samples, *mecC*-positive methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were detected [19]. Moreover, five *S. sciuri* or *S. fleurettii* isolates harbored the *mecA* gene but were phenotypically susceptible to ceftiofur, which has been formerly reported among CoNS of diverse origins [12,31]. *mecA* gene homologues that are not always associated with methicillin resistance have been found in *S. sciuri* and *S. fleurettii* [11], but the primers used in this study do not amplify these *mecA* homologues. Hence, the methicillin-susceptible phenotype could be attributed to the heterogeneous expression of the *mecA* gene. We could not identify the mechanism implicated in penicillin resistance in 26 isolates, which has been formerly reported among CoNS [26,27]. This fact suggests that other unknown resistance mechanisms are present in the isolates investigated or that the breakpoints for this antimicrobial are not accurate for CoNS. The extremely high resistance rate to clindamycin detected (90%) is worrisome as this antimicrobial is widely used in clinical and veterinary medicine. Among the *S. sciuri* isolates, clindamycin resistance was mainly mediated by the presence of the *sal(A)* gene, which confers intrinsic resistance to lincosamides and streptogramin A antimicrobials in this species [32]. Although the *sal(A)* gene has been previously described in non-*S. sciuri* CoNS species from pets in China [33], in this work, it was only detected in *S. sciuri*. Macrolides and lincosamides resistance mediated by the *erm(43)* gene was detected in seven *S. lentus* isolates. This gene has been formerly detected among isolates belonging to the species *S. lentus* and *S. sciuri* of diverse origins, including healthy wild animals [25,34]. It is necessary to note the high tetracycline resistance rate (60%) observed among the *S. lentus* isolates with respect to the overall tetracycline rate of CoNS (17%), which was mostly mediated by the *tet(K)* gene. Similar resistance rates in *S. lentus* were detected in isolates recovered from livestock [29,35], which could be attributable to the extended use of this antimicrobial in veterinary medicine. The location of *dfr(K)* next to the *tet(L)* gene in one *S. lentus*

isolate suggests their location in a pKKS2187-like plasmid previously reported among MRSA-CC398 and MRCoNS of pig origin [29,36]. This supports the hypothesis that red kites could acquire CoNS from livestock carrion at the vulture restaurant via direct contact or the food chain. In cinereous vulture chicks, the potential route of colonization is less obvious. Cinereous vultures generally feed on medium-sized native carrion and, in the case of this colony situated in a National Park close to Madrid, no feeding station (vulture restaurant) is in the range of foraging of the vultures during chick raising. However, observation of birds ringed at the colony foraging on solid urban waste landfills [37] suggests that one of the potential sources for colonization by CoNS could be exposure of the adults in the landfill environment and subsequent colonization of the nestlings, or exposure of the latter from landfill foraged food, as has been shown for CoPs in white stork nestlings [38]. However, to date, no detailed information on the degree of exposure of the cinereous vulture chicks to landfill foraged food is available. Fusidic acid resistance rates above 50% were also reported in CoNS from livestock and the livestock environment and birds of prey [8,9,12,26,29], which suggests the presence of mutations in the *fusA* gene or intrinsic resistance genes like the *fusD* in *S. saprophyticus* and *fusE* in *S. cohnii* subsp. *urealyticus* [39]. Fortunately, all CoNS isolates from wild birds exhibited susceptibility to linezolid, which is considered as a last resort antimicrobial in human medicine used to treat serious infections caused by multidrug resistant Gram-positive bacteria, including MRCoNS.

In this study, two *S. sciuri* isolates harbored the *tst* gene encoding the pyrogenic toxin superantigen TSST-1 that is considered one of the most important virulence factors produced by *S. aureus*. It is located on staphylococcal pathogenicity islands (SaPIs) and its mobilization is assisted by different phages [40]. This gene has been formerly described among clinical CoNS isolates but also among those recovered from bovine milk [2,13,41]; however, to best of our knowledge, this is the first description of *tst*-carrying CoNS isolates from wild animals. Apart from the enterotoxigenic potential, few studies that explore the prevalence of major virulence factors of *S. aureus* in CoNS exist.

As previously reported by other authors, the SCC*mec* type IV and, especially, type III are the most common types detected among CoNS isolates of animal origin [8,28,42]. However, the majority of *mecA*-carrying isolates could not be SCC*mec* typed with the primers used, which highlights the high diversity of SCC*mec* types among CoNS and suggests the presence of novel SCC*mec* elements different from those found in MRSA isolates.

5. Conclusions

Free-living predatory birds are frequently colonized by CoNS species, especially *S. sciuri*. In this study we have demonstrated that wild birds are a reservoir of CoNS carrying not only important antimicrobial resistance genes, but also major virulence factors traditionally associated with *S. aureus*. Scavenging on livestock from intensive production (pork and poultry) and foraging on landfills are a potential source of CoNS isolates recovered from wild birds. The detection of two *S. sciuri* isolates carrying the *tst* gene in wildlife is of great concern.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1317/s1>. Table S1: Primer pairs used for the characterization of CoNS recovered from wild birds; Table S2: Antimicrobial resistance phenotype and genotype, and virulence gene content of the 173 CoNS recovered from free-ranging birds; Table S3: SCC*mec* typing of the 47 CoNS isolates from wild birds that carried the *mecA* gene.

Author Contributions: C.T., M.Z., and U.H. designed the study; L.R.-R., P.G., C.A.A., and R.F.-F. performed the experiments and analyzed the data. M.C.C., Y.R., J.d.l.P., M.Á.Q., J.M.B., and G.B. collected the samples. L.R.-R. and C.T. made the first analysis of the data and prepared the draft of the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by project SAF2016-76571-R from the Agencia Estatal de Investigación (AEI) of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) of EU, project RTA2015-00088-C03-02 from the National Institute for Agricultural Research and Technology INIA) and Sierra de Guadarrama National Park in the monitoring of the black vulture colony Alto Lozoya. Laura Ruiz-Ripa has a pre-doctoral fellowship from the Universidad de La Rioja. Rosa Fernández-Fernández has a predoctoral fellowship FPU from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades of Spain (FPU18/05438). Maria Cruz Camacho was supported by a predoctoral fellowship from the regional government of Castilla – La Mancha (JCCM).

Acknowledgments: Part of this work was presented at the XXI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Málaga, May 2017. Forest agents from Madrid helped in the sampling of cinereus vulture chicks.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ünal, N.; Çınar, O.D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* **2012**, *44*, 369–375. [[CrossRef](#)]
2. Bertelloni, F.; Fratini, F.; Ebani, V.V.; Galiero, A.; Turchi, B.; Cerri, D. Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1, and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. *Dairy Sci. Technol.* **2015**, *95*, 341–352. [[CrossRef](#)]
3. Heilmann, C.; Ziebuhr, W.; Becker, K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 1071–1080. [[CrossRef](#)]
4. Becker, K.; Heilmann, C.; Peters, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 870–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Pyörälä, S.; Taponen, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* **2009**, *134*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pyzik, E.; Marek, A.; Stępień-Pyśniak, D.; Urban-Chmiel, R.; Jarosz, L.S.; Jagiełło-Podębska, I. Detection of antibiotic resistance and classical enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from poultry in Poland. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 183–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Stępień-Pyśniak, D.; Wilczyński, J.; Marek, A.; Śmiech, A.; Kosikowska, U.; Hauschild, T. *Staphylococcus simulans* associated with endocarditis in broiler chickens. *Avian Pathol.* **2017**, *46*, 44–51. [[CrossRef](#)]
8. Nemeghaire, S.; Vanderhaeghen, W.; Angeles Argudín, M.; Haesebrouck, F.; Butaye, P. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2928–2934. [[CrossRef](#)]
9. Schoenfelder, S.M.K.; Dong, Y.; Feßler, A.T.; Schwarz, S.; Schoen, C.; Köck, R.; Ziebuhr, W. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Vet. Microbiol.* **2017**, *200*, 79–87. [[CrossRef](#)]
10. Otto, M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. *BioEssays* **2013**, *35*, 4–11. [[CrossRef](#)]
11. Tsubakishita, S.; Kuwahara-Arai, K.; Sasaki, T.; Hiramatsu, K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4352–4359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ruiz-Ripa, L.; Feßler, A.T.; Hanke, D.; Sanz, S.; Olarte, C.; Mama, O.M.; Eichhorn, I.; Schwarz, S.; Torres, C. Coagulase-negative staphylococci carrying *cfr* and PVL genes, and MRSA/MSSA-CC398 in the swine farm environment. *Vet. Microbiol.* **2020**, *243*, 108631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Giormezis, N.; Kolonitsiou, F.; Foka, A.; Drougka, E.; Liakopoulos, A.; Makri, A.; Papanastasiou, A.D.; Vogiatzi, A.; Dimitriou, G.; Marangos, M.; et al. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: The role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 1500–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mama, O.M.; Morales, L.; Ruiz-Ripa, L.; Zarazaga, M.; Torres, C. High prevalence of multidrug resistant *S. aureus*-CC398 and frequent detection of enterotoxin genes among non-CC398 *S. aureus* from pig-derived food in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *320*, 108510. [[CrossRef](#)]
15. Chen, S.; Wang, Y.; Chen, F.; Yang, H.; Gan, M.; Zheng, S.J. A highly pathogenic strain of *Staphylococcus sciuri* caused fatal exudative epidermitis in piglets. *PLoS ONE* **2007**, *2*, 1–6. [[CrossRef](#)]
16. De Martino, L.D.; Lucido, M.; Mallardo, K.; Facello, B.; Mallardo, M.; Iovane, G.; Pagnini, U.; Tufano, M.A.; Catalanotti, P. Methicillin-resistant staphylococci isolated from healthy horses and horse personnel in Italy. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2010**, *22*, 77–82. [[CrossRef](#)]
17. Gómez-Sanz, E.; Ceballos, S.; Ruiz-Ripa, L.; Zarazaga, M.; Torres, C. Clonally diverse methicillin and multidrug resistant coagulase negative staphylococci are ubiquitous and pose transfer ability between pets and their owners. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 485. [[CrossRef](#)]

18. Bonnedahl, J.; Järhult, J.D. Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala J. Med. Sci.* **2014**, *119*, 113–116. [[CrossRef](#)]
19. Ruiz-Ripa, L.; Gómez, P.; Alonso, C.A.; Camacho, M.C.; de la Puente, J.; Fernández-Fernández, R.; Ramiro, Y.; Quevedo, M.A.; Blanco, J.M.; Zarazaga, M.; et al. Detection of MRSA of Lineages CC130-*mecC* and CC398-*mecA* and *Staphylococcus delphini-lnu(A)* in Magpies and Cinereous Vultures in Spain. *Microb. Ecol.* **2019**, *78*, 409–415. [[CrossRef](#)]
20. Matsuda, N.; Matsuda, M.; Notake, S.; Yokokawa, H.; Kawamura, Y.; Hiramatsu, K.; Kikuchia, K. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3862–3866. [[CrossRef](#)]
21. EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 9.0*; EUCAST: Växjö, Sweden, 2019.
22. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie- Recommandation*; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Basel, Switzerland, 2013.
23. Schwarz, S.; Silley, P.; Simjee, S.; Woodford, N.; van duijkeren, E.; Johnson, A.P.; Gaastra, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 601–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kondo, Y.; Ito, T.; Ma, X.X.; Watanabe, S.; Kreiswirth, B.N.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mama, O.M.; Ruiz-Ripa, L.; Lozano, C.; González-Barrio, D.; Ruiz-Fons, J.F.; Torres, C. High diversity of coagulase negative staphylococci species in wild boars, with low antimicrobial resistance rates but detection of relevant resistance genes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *64*, 125–129. [[CrossRef](#)]
26. Sousa, M.; Silva, N.; Igrejas, G.; Sargo, R.; Benito, D.; Gómez, P.; Lozano, C.; Manageiro, V.; Torres, C.; Caniça, M.; et al. Genetic diversity and antibiotic resistance among coagulase-negative staphylococci recovered from birds of prey in Portugal. *Microb. Drug Resist.* **2016**, *22*, 727–730. [[CrossRef](#)]
27. Gómez, P.; Casado, C.; Sáenz, Y.; Ruiz-Ripa, L.; Estepa, V.; Zarazaga, M.; Torres, C. Diversity of species and antimicrobial resistance determinants of staphylococci in superficial waters in Spain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, *93*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zhang, Y.; Agidi, S.; Lejeune, J.T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1375–1383. [[CrossRef](#)]
29. Ugwu, C.C.; Gomez-Sanz, E.; Agbo, I.C.; Torres, C.; Chah, K.F. Characterization of mannitol-fermenting methicillin-resistant staphylococci isolated from pigs in Nigeria. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 885–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Loncaric, I.; Kübber-heiss, A.; Posautz, A.; Ruppitsch, W.; Lepuschitz, S.; Schauer, B.; Feßler, A.T.; Krametter-frötscher, R.; Harrison, E.M.; Holmes, M.A.; et al. Characterization of *mecC* gene-carrying coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from various animals. *Vet. Microbiol.* **2019**, *230*, 138–144. [[CrossRef](#)]
31. Kulangara, V.; Nair, N.; Sivasailam, A.; Sasidharan, S.; Kollannur, J.D.; Syam, R. Genotypic and phenotypic β -lactam resistance and presence of PVL gene in Staphylococci from dry bovine udder. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–9. [[CrossRef](#)]
32. Hot, C.; Berthet, N.; Chesneau, O. Characterization of *sal(A)*, a Novel Gene Responsible for Lincosamide and Streptogramin A resistance in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3335–3341. [[CrossRef](#)]
33. Deng, F.; Wang, H.; Liao, Y.; Li, J.; Feßler, A.T.; Michael, G.B.; Schwarz, S.; Wang, Y. Detection and Genetic Environment of Pleuromutilin-Lincosamide- Streptogramin A Resistance Genes in Staphylococci Isolated from Pets. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Schwendener, S.; Perreten, V. New MLS B resistance gene *erm(43)* in *Staphylococcus lentus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 4746–4752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Vanderhaeghen, W.; Vandendriessche, S.; Crombé, F.; Nemeghaire, S.; Dispas, M.; Denis, O.; Hermans, K.; Haesebrouck, F.; Butaye, P. Characterization of methicillin-resistant non-*Staphylococcus aureus* staphylococci carriage isolates from different bovine populations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 300–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. 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*, 776–778. [[CrossRef](#)]
37. Monclús, L.; Lopez-Bejar, M.; De la Puente, J.; Covaci, A.; Jaspers, V.L.B. Can variability in corticosterone levels be related to POPs and OPEs in feathers from nestling cinereous vultures (*Aegypius monachus*)? *Sci. Total Environ.* **2019**, *650*, 184–192. [[CrossRef](#)]
38. Gómez, P.; Lozano, C.; Camacho, M.C.; Lima-Barbero, J.F.; Hernández, J.M.; Zarazaga, M.; Höfle, Ú.; Torres, C. Detection of MRSA ST3061-t843-*mecC* and ST398-t011-*mecA* in white stork nestlings exposed to human residues. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 53–57. [[CrossRef](#)]
39. O'Neill, A.J.; McLaws, F.; Kahlmeter, G.; Henriksen, A.S.; Chopra, I. Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1737–1740. [[CrossRef](#)]
40. Novick, R.P.; Ram, G. Staphylococcal pathogenicity islands—Movers and shakers in the genomic firmament. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, *38*, 197–204. [[CrossRef](#)]
41. Martins, K.B.; Faccioli, P.Y.; Bonesso, M.F.; Fernandes, S.; Oliveira, A.A.; Dantas, A.; Zafalon, L.F.; Maria de Lourdes, R.S. Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 2184–2195. [[CrossRef](#)]
42. Saber, H.; Jasni, A.S.; Jamaluddin, T.Z.M.T.; Ibrahim, R. A review of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types in coagulase-negative staphylococci (CoNS) species. *Malays. J. Med. Sci.* **2017**, *24*, 7–18. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Coagulase-negative staphylococci carrying *cfr* and PVL genes, and MRSA/MSSA-CC398 in the swine farm environment

Laura Ruiz-Ripa^a, Andrea T. Feßler^b, Dennis Hanke^b, Susana Sanz^a, Carmen Olarte^a, Olouwafemi Mistourath Mama^a, Inga Eichhorn^b, Stefan Schwarz^b, Carmen Torres^{a,*}

^a Department of Food and Agriculture, University of La Rioja, Logroño, Spain

^b Institute of Microbiology and Epizootics, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

MRSA-CC398

CoNS

PVL

Linezolid resistance

cfr

Swine-farm

ABSTRACT

This work aimed at characterizing four *Staphylococcus aureus* and 68 coagulase-negative staphylococci (CoNS), recovered from the air and liquid manure tank of two swine farms with intensive- and semi-extensive-production types, for their antimicrobial resistance pheno-/genotypes and their virulence gene content. Molecular typing was performed by *spa* typing, MLST, *agr* typing, and *SCCmec* typing, where applicable. Conjugation experiments were performed to assess the transferability of the linezolid resistance gene *cfr*, and its genetic environment was determined by Whole-Genome-Sequencing. The four *S. aureus* (intensive-production farm, IP-farm) were typed as t011-*agrI*-CC398-ST398, were *scn*-negative and two of them were methicillin-resistant (MRSA) with the *mecA* gene (*SCCmec-V*). Multidrug resistance was seen in 87 % of the CoNS. Statistically significant differences among the antimicrobial resistance rates of CoNS from the two farms were observed for cefoxitin, aminoglycosides, tetracycline, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole. Eight methicillin-resistant CoNS, which were recovered from the IP-farm, carried the *mecA* gene. One *S. simulans* isolate was PVL-positive and three *S. cohnii eta*-positive. One *S. equorum* and one *S. arlettae* showed linezolid resistance and carried the *cfr* gene (IP-farm), which was non-transferable by conjugation into *S. aureus*. The *cfr* genetic context in both isolates was identical, with the *lsa(B)* gene located upstream of *cfr*. The environment of swine farms might contribute to the dissemination of CoNS that show multidrug resistance and harbor important virulence factors.

1. Introduction

Staphylococcus spp. are ubiquitous bacteria widely disseminated in the environment. They can be harmless colonizers of the mucous membranes and the skin of humans and animals. However, several staphylococcal species can also act as opportunistic pathogens causing diseases of diverse severity in different host species, including humans, livestock and companion animals (Unal and Cinar, 2012; Becker et al., 2014; Bertelloni et al., 2015; Ceballos et al., 2019). The genus *Staphylococcus* is divided in two major groups depending on their capacity to produce the enzyme coagulase, and therefore their capacity to clot the blood plasma: coagulase-positive staphylococci (CoPS), with *Staphylococcus aureus* being the most representative species, and coagulase-negative staphylococci (CoNS).

Pigs are the main reservoir of livestock-associated methicillin-resistant *S. aureus* (LA-MRSA) belonging to the clonal complex CC398, though this genetic lineage can also be transmitted from livestock to humans and vice versa (Price et al., 2012). In fact, infections caused by

MRSA-CC398 in humans have increased significantly during the last years. In a recent study performed in Spain, the density of pigs of the region has been postulated as a main risk factor for MRSA-CC398 infections in humans (Ceballos et al., 2019).

Traditionally, CoNS were considered as less pathogenic than CoPS. However, in recent years, CoNS have been recognized as important opportunistic pathogens, especially the species *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, and *S. saprophyticus* (Becker et al., 2014). There are some important virulence factors strongly associated with *S. aureus* that have been detected in coagulase-negative species isolated from livestock, such as the Pantone-Valentine leukocidin (PVL) and the toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) (Unal and Cinar, 2012; Bertelloni et al., 2015). The phenomenon of multiresistance among CoNS of diverse origins is becoming prevalent. In a previous study conducted in livestock environments in Germany, several CoNS isolates were found, which showed resistance to last resort antimicrobial agents in human medicine, as for example linezolid (Schoenfelder et al., 2017). This is an important antimicrobial agent used to treat serious infections in

* Corresponding author at: Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006, Logroño, Spain.

E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Brief report

Detection of a *cfr*-positive MRSA CC398 strain in a pig farmer in Spain

Laura Ruiz-Ripa^a, Alba Bellés^b, Mercè García^b, Carmen Torres^{a,*}

^a Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

^b Sección de Microbiología, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2020

Accepted 13 March 2020

Available online xxx

Keywords:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

CC398

cfr

linezolid

ABSTRACT

Objective: To characterize one linezolid- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolate recovered from a nasal sample of a pig farmer patient.

Methods: The detection of linezolid resistance mechanisms was performed by PCR and sequencing. The antimicrobial resistance and virulence profile was investigated, and the molecular typing was performed by molecular techniques. The transference of *cfr* gene was assessed by conjugation experiments and its genetic environment was investigated by specific PCRs.

Results: The linezolid-resistant MRSA isolate was typed as t011-ST398/CC398-SCCmecV-*agr*I and carried the *cfr* gene. The isolate was multidrug-resistant but lacked the virulence genes studied. The *cfr* gene was co-located with the *fexA* gene on a Tn558 variant and was successfully transferred by conjugation.

Conclusion: We report the first description of LA-MRSA-CC398 carrying the *cfr* gene in Spain. This finding highlights the importance of surveillance programmes to determine the presence and spread of the *cfr* gene in the livestock and clinical settings.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Detección de una cepa SARM del linaje CC398 y portadora del gen *cfr* en un granjero de cerdos en España

RESUMEN

Objetivo: Caracterizar una cepa *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y a linezolid aislada de una muestra nasal de un paciente granjero de cerdos.

Métodos: Mediante PCR y secuenciación se investigaron los mecanismos de resistencia a linezolid. Se determinó el perfil de resistencia a antimicrobianos y el perfil de virulencia, y se llevó a cabo el tipado molecular mediante diferentes técnicas moleculares. Se estudió la transferibilidad del gen *cfr* por conjugación y su entorno genético mediante PCR específicas.

Resultados: El aislado fue tipado como t011-ST398/CC398-SCCmecV-*agr*I y portaba el gen *cfr*. Presentó un fenotipo/genotipo de multiresistencia, pero carecía de los genes de virulencia estudiados. Se detectó el gen *cfr* junto con *fexA* en una variante del Tn558 y se transfirió mediante conjugación.

Conclusión: Se describe el primer aislado SARM-CC398 *cfr*-positivo en España. Esto destaca la importancia de implementar programas de vigilancia para determinar su presencia y dispersión en el ámbito clínico y ganadero.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Palabras clave:
Staphylococcus aureus resistente a meticilina
CC398
cfr
Linezolid

Introduction

Staphylococcus aureus clonal complex CC398 is the most common genetic lineage of livestock-associated (LA) methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in Europe. Pigs are the main host of

* Corresponding author.
E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.03.006>

0213-005X/© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Mechanisms of Linezolid Resistance Among Clinical *Staphylococcus* spp. in Spain: Spread of Methicillin- and Linezolid-Resistant *S. epidermidis* ST2

Laura Ruiz-Ripa,¹ Andrea T. Feßler,² Dennis Hanke,² Inga Eichhorn,² José Manuel Azcona-Gutiérrez,³
Carla Andrea Alonso,³ Mar Olga Pérez-Moreno,⁴ Carmen Aspiroz,⁵ Alba Bellés,⁶
Stefan Schwarz,² and Carmen Torres¹

This study aimed at determining the mechanisms of linezolid resistance and the molecular characteristics of clinical *Staphylococcus aureus* ($n = 2$) and coagulase-negative staphylococci ($n = 15$) isolates obtained from four Spanish hospitals. The detection of linezolid resistance mechanisms (mutations and acquisition of resistance genes) was performed by PCR/sequencing. The antimicrobial resistance and virulence profile was determined, and the isolates were typed by different molecular techniques. Moreover, the genetic environment of the *cfr* gene was determined by whole-genome sequencing. The *cfr* gene was detected in one methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) that also displayed the amino acid change Val118Ala in the ribosomal protein L4. The second *S. aureus* isolate was methicillin susceptible and showed different alterations in the ribosomal protein L4. All remaining linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* ($n = 14$) and *Staphylococcus hominis* isolates ($n = 1$) showed the mutation G2576T ($n = 14$) or C2534T ($n = 1$) in the 23S rRNA. Moreover, different amino acid changes were detected in the ribosomal proteins L3 and L4 in *S. epidermidis* isolates. All *S. epidermidis* isolates belonged to the multilocus sequence type ST2. Linezolid-resistant staphylococci (LRS) showed a multiresistance phenotype, including methicillin resistance that was detected in all isolates but one, and was mediated by the *mecA* gene. The *cfr* gene in the MRSA isolate was located together with the *fexA* gene on a conjugative 38,864 bp plasmid. Linezolid- and methicillin-resistant *S. epidermidis* ST2 showing mutations in the 23S rRNA and in the ribosomal proteins L3 and L4 are spread among Spanish hospitals, whereas LRS carrying acquired linezolid resistance genes are rarely detected.

Keywords: linezolid, *S. epidermidis*, ST2, *S. aureus*, *cfr*

Introduction

METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) are important pathogens involved in community- and hospital-associated infections. Frequently, these bacteria are not only resistant to β -lactam antibiotics, but also to several other classes of antimicrobial agents.^{1,2} This fact, in addition to the capacity of certain staphylo-

coccal species, such as *Staphylococcus epidermidis*, to produce biofilms, compromise the therapeutic success.²

In this context, linezolid is the first member of the oxazolidinone class of antimicrobial agents, which has demonstrated good efficacy against multiresistant Gram-positive pathogens, including MRSA and MRCoNS.^{1,3,4} Nearly two decades after its introduction into clinical use, linezolid remains active against $\sim 99\%$ of Gram-positive bacteria.⁵

¹Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

²Institute of Microbiology and Epizootics, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

³Servicio Microbiología, Hospital San Pedro, Logroño, Spain.

⁴Clinical Laboratory, Microbiology Area, Hospital Verge de la Cinta, Tortosa, Spain.

⁵Servicio Microbiología, Hospital Royo-Villanova, Zaragoza, Spain.

⁶Sección Microbiología, Hospital Universitari Arnau Vilanova, Lleida, Spain.

This work was partially presented at the 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Amsterdam, the Netherlands, April 2019.



Short Communication

Detection of *poxtA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm

Laura Ruiz-Ripa^a, Andrea T. Feßler^b, Dennis Hanke^b, Susana Sanz^a, Carmen Olarte^a, Inga Eichhorn^b, Stefan Schwarz^b, Carmen Torres^{a,*}

^a Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain

^b Institute of Microbiology and Epizootics, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2019

Accepted 16 December 2019

Available online 26 December 2019

Keywords:

Linezolid

Conjugative transfer

Multiresistance

Public Health

ABSTRACT

Objective: Two linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolates, C10004 and C10009, were recovered from air samples of a Spanish swine farm and comprehensively characterized.

Methods: Detection of linezolid resistance mechanisms (mutations and acquisition of resistance genes) was performed by PCR/sequencing. Isolates were characterized by multilocus sequence typing (MLST), antimicrobial susceptibility testing, detection of antimicrobial resistance and virulence genes, and analysis of the genetic environment of the linezolid resistance genes. The characterization of isolate C10009 was performed by Whole-Genome-Sequencing and of isolate C10004 by PCR and amplicon sequencing, where applicable. Conjugation experiments to assess the transferability of the *optrA* and *poxtA* genes implicated in linezolid resistance were performed.

Results: The linezolid-resistant *E. faecium* isolates C10004 and C10009, assigned to ST128 and ST437, respectively, harbored the *optrA* and *poxtA* genes. Neither mutations in the 23S rRNA nor in the genes for the ribosomal proteins L3, L4 and L22 were detected. C10004 and C10009 carried fourteen and thirteen antimicrobial resistance genes, respectively. The sequence alignment indicated that the genetic environment of the *poxtA* gene was identical in both isolates, with a downstream-located *fexB* gene. The *poxtA* gene was transferred by conjugation together with the *fexB* gene, and also with *tet(M)* and *tet(L)* in the case of isolate C10004. The *optrA* gene could not be transferred.

Conclusions: This is the first report of the *poxtA* gene in Spain. The presence of *poxtA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples represents a public health concern, indicating an involvement of swine farms in the spread of linezolid-resistant bacteria.

© 2019 International Society for Antimicrobial Chemotherapy. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The oxazolidinone linezolid is a highly effective antimicrobial agent to treat serious infections caused by multidrug-resistant Gram-positive bacteria in humans, including vancomycin-resistant enterococci (VRE) [1]. This antimicrobial is not approved for use in veterinary medicine worldwide, however, active surveillance of oxazolidinone-resistant enterococci, and the detection of transferable oxazolidinone resistance genes in the livestock-setting have increased in recent years [2–5].

Since its introduction into clinical use in 2000, several mechanisms of linezolid resistance have been described related either to mutations in the 23S rRNA, to amino acid changes in the

ribosomal proteins L3, L4, and L22, or to the acquisition of resistance genes [1]. Recently, two novel transferable genes coding for members of the ABC-F family of ATP-binding cassette proteins were described, *optrA* and *poxtA* [2,6]. The *optrA* gene, which confers resistance to oxazolidinones and phenicols, was first described in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* of human and animal origin [2], and thereafter in other *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus suis* worldwide [3,7,8]. The *optrA* gene is commonly located on plasmids or in the chromosomal DNA [9], but has recently also been detected as part of integrative and conjugative elements, a prophage, and a novel transposon of the Tn554 family [8,10]. The *poxtA* gene, mediates decreased susceptibility to oxazolidinones, phenicols and tetracyclines. It was first reported in a clinical MRSA isolate [6], but has meanwhile also been detected in different Gram-positive bacteria, primarily of animal origin [3–5,11].

Although more than 99% of the Gram-positive pathogens are still linezolid-susceptible [12], linezolid resistance represents a

* Corresponding author at: Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, 26006, Logroño, Spain.
E-mail address: carmen.torres@unirioja.es (C. Torres).



Article

Mechanisms of Linezolid Resistance Among Enterococci of Clinical Origin in Spain—Detection of *optrA*- and *cfr(D)*-Carrying *E. faecalis*

Laura Ruiz-Ripa ¹, Andrea T. Feßler ², Dennis Hanke ², Inga Eichhorn ², José Manuel Azcona-Gutiérrez ³, Mar Olga Pérez-Moreno ⁴, Cristina Seral ⁵, Carmen Aspiroz ⁶, Carla Andrea Alonso ³, Luis Torres ⁷, Juan-Ignacio Alós ⁸, Stefan Schwarz ² and Carmen Torres ^{1,*}

¹ Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain; laura_ruiz_10@hotmail.com

² Institute of Microbiology and Epizootics, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany; andrea.fessler@fu-berlin.de (A.T.F.); dennis.hanke@fu-berlin.de (D.H.); inga.eichhorn@fu-berlin.de (I.E.); stefan.schwarz@fu-berlin.de (S.S.)

³ Servicio Microbiología, Hospital San Pedro, 26006 Logroño, Spain; jmazcona@riojasalud.es (J.M.A.-G.); caalonso@riojasalud.es (C.A.A.)

⁴ Servicio Microbiología, Hospital Verge de la Cinta, 43500 Tortosa, Spain; marolgap@gmail.com

⁵ Servicio Microbiología, Hospital Universitario Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain; cseral@salud.aragon.es

⁶ Servicio Microbiología, Hospital Royo-Villanova, 50015 Zaragoza, Spain; caspirozs@gmail.com

⁷ Servicio Microbiología, Hospital San Jorge, 22004 Huesca, Spain; ltorres@salud.aragon.es

⁸ Servicio Microbiología, Hospital Universitario de Getafe, 28905 Getafe, Spain; nachoalos@telefonica.net

* Correspondence: carmen.torres@unirioja.es; Tel.: +34-941-299-750; Fax: +34-941-299-721

Received: 8 July 2020; Accepted: 28 July 2020; Published: 30 July 2020



Abstract: The mechanisms of linezolid resistance among 13 *E. faecalis* and 6 *E. faecium* isolates, recovered from six Spanish hospitals during 2017–2018, were investigated. The presence of acquired linezolid resistance genes and mutations in 23S rDNA and in genes encoding for ribosomal proteins was analyzed by PCR and amplicon sequencing. Moreover, the susceptibility to 18 antimicrobial agents was investigated, and the respective molecular background was elucidated by PCR-amplicon sequencing and whole genome sequencing. The transferability of the linezolid resistance genes was evaluated by filter-mating experiments. The *optrA* gene was detected in all 13 *E. faecalis* isolates; and one *optrA*-positive isolate also carried the recently described *cfr(D)* gene. Moreover, one *E. faecalis* isolate displayed the nucleotide mutation G2576T in the 23S rDNA. This mutation was also present in all six *E. faecium* isolates. All linezolid-resistant enterococci showed a multiresistance phenotype and harbored several antimicrobial resistance genes, as well as many virulence determinants. The *fexA* gene was located upstream of the *optrA* gene in 12 of the *E. faecalis* isolates. Moreover, an *erm(A)*-like gene was located downstream of *optrA* in two isolates recovered from the same hospital. The *optrA* gene was transferable in all but one *E. faecalis* isolates, in all cases along with the *fexA* gene. The *cfr(D)* gene was not transferable. The presence of *optrA* and mutations in the 23S rDNA are the main mechanisms of linezolid resistance among *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. We report the first description of the *cfr(D)* gene in *E. faecalis*. The presence of the *optrA* and *cfr(D)* genes in Spanish hospitals is a public health concern.

Keywords: whole genome sequencing; *optrA*; *cfr(D)*; linezolid; *Enterococcus* spp.

1. Introduction

On the one hand, enterococci, especially the species *Enterococcus faecalis* (Efs) and *Enterococcus faecium* (Efm) can be harmless colonizers of the human intestinal tract, but on the other hand, they are also one of the most important bacterial genera related to hospital-associated infections worldwide. Enterococci possess intrinsic resistance to different antimicrobial agents commonly used to treat infections caused by Gram-positive pathogens, such as cephalosporins and aminoglycosides (low-level resistance). They also have a great capacity to acquire mobile genetic elements carrying antimicrobial resistance genes, which limits the therapeutic options [1].

Linezolid was the first oxazolidinone approved for clinical use in human medicine and is considered as a last resort antimicrobial agent. It is an important treatment option for serious infections (such as nosocomial and community-acquired pneumonia, and complicated skin and soft tissue infections) caused by multiresistant Gram-positive bacteria, including vancomycin-resistant enterococci [2–4].

The most common mechanism of oxazolidinone resistance among clinical isolates is attributable to point mutations in the central loop of domain V of the 23S rDNA, which, in some cases, has been related to long-term treatment with linezolid. The most common nucleotide exchange described is G2576T (*E. coli* numbering) although other mutations have been reported (e.g., C2534T, T2500A, and G2447T) [1,5]. Moreover, different amino acid exchanges, deletions, and insertions in the ribosomal proteins L3 (*rplC*), L4 (*rplD*), and L22 (*rplV*)—although of lesser significance—have also been associated with decreased susceptibility to linezolid [1,3].

To date, up to five acquired linezolid resistance genes have been described among *Enterococcus* spp.: *cfr*, *cfr*(B), *cfr*(D), *optrA*, and *poxtA*. The multiresistance gene *cfr*, which encodes an rRNA methyltransferase [6], was first described in the plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri* [7] and was thereafter reported in various Gram-positive and Gram-negative bacteria of diverse origin [8]. Besides resistance towards oxazolidinones, it also confers resistance to phenicols, lincosamides, pleuromutilins, and streptogramin A antimicrobials (PhLOPS_A phenotype). In addition, variants of the *cfr* gene [*cfr*(B), *cfr*(D)] have been described in clinical enterococcal isolates [9–11]. However, the contribution of *cfr*-like genes to reduce the susceptibility to linezolid in enterococci is still under debate [11,12]. The *optrA* gene encodes an ATP-binding cassette F (ABC-F) protein [13] that confers resistance to oxazolidinones and phenicols. It was originally described among animal and human Efs and Efm isolates from China [14]. More recently, the new gene *poxtA*—which confers decreased susceptibility to oxazolidinones, phenicols, and tetracycline—was initially reported in a clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. Like *optrA*, this gene encodes a protein of the antibiotic resistance (ARE) ABC-F family but shows only 32% amino acid identity with *OptrA* [15]. The *poxtA* gene has also been detected in Efs and Efm and is usually located in a composite transposon [15,16].

Although linezolid resistance remains uncommon (>99% of Gram-positive pathogens are still susceptible) [17], different antimicrobial surveillance studies/programs demonstrated that the number of linezolid-resistant *Enterococcus* (LRE) has increased during recent years [17–20]. Thus, this study aimed at determining the mechanisms of linezolid resistance and studying the molecular characteristics of LRE recovered from Spanish hospitals.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Collection

A total of 13 Efs (Table 1) and six Efm isolates (Table 2) identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and classified as intermediate or resistant to linezolid [21], were recovered during 2017–2018 in six hospitals located in five different regions of Spain. The hospitals that took part in this study are the following: Hospital San Pedro (Logroño), Hospital Royo-Villanova (Zaragoza), Hospital Lozano Blesa (Zaragoza),

Hospital Verge de la Cinta (Tortosa), Hospital San Jorge (Huesca), and Hospital Universitario de Getafe (Getafe) (Supplementary Figure S1).

2.2. Antimicrobial Resistance Phenotype

The susceptibility to penicillin, ampicillin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, linezolid, vancomycin, teicoplanin, daptomycin, and sulfamethoxazole-trimethoprim was studied using the MicroScan[®] system (Beckmann Coulter, Nyon, Switzerland). The MICs to chloramphenicol, florfenicol, kanamycin, and rifampicin were determined by broth macrodilution using *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 and *E. faecalis* ATCC[®] 29212 (Manassas, VA, USA) as quality controls, and to linezolid and tedizolid by E-test[®] (bioMérieux, Durham, NC, USA). The antimicrobial susceptibility testing was performed, depending on the hospital, according to CLSI [21] or EUCAST [22] standards. The CLSI criteria [21] were used in the case of linezolid for all enterococcal isolates.

2.3. Mechanisms of Linezolid Resistance

All LRE were checked for the presence of the linezolid resistance genes *cfr*, *cfr(B)*, *cfr(D)*, *optrA*, and *poxtA* by PCR and confirmed by amplicon sequencing (Supplementary Table S1). Mutations in the domain V of the 23S rDNA were studied by PCR (Supplementary Table S1) and amplicon sequencing, and by digestion of the amplicon with the *NheI* restriction enzyme [23]. Mutations leading to amino acid changes in the ribosomal proteins L3, L4, and L22 were determined in all isolates by PCR and amplicon sequencing (Supplementary Table S1). The obtained sequences were compared with those of the linezolid-susceptible wild type strains *E. faecium* DO (GenBank accession number CP003583) and *E. faecalis* ATCC[®] 29212 (GenBank accession number CP008816) using the EMBOSS Needle pairwise alignment from the EBI website.

2.4. Molecular Characterization

LREs isolates were subjected to whole genome sequencing (WGS). After a pretreatment of the enterococci with an enzyme solution (20 mg/mL lysozyme, 20 mM TRIS-HCl, pH = 8, 2 mM EDTA, 1.2% Triton) for 30 min at 37 °C, 20 µL of proteinase K and 1 µL of RNase (2 µg/µL) were added, the samples were mixed and incubated for 2 min at room temperature. Then, the DNA extraction was carried out using the QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The libraries for WGS were prepared using the Nextera XT library preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing (2 × 300 bp paired-end sequencing in 40-fold multiplexes) was performed on the Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) platform. Sequences were *de novo* assembled using MIRA (Biomatters, Auckland, New Zealand), and annotated using RAST [24]. The nucleotide sequences were analyzed using Geneious (Biomatters, Auckland, New Zealand), and with the online tools ResFinder 3.2 [25], VirulenceFinder 2.0 [26], and MLST 2.0 [27] of the Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>), and ISfinder [28]. The nucleotide sequence alignments were performed using Geneious alignment with default settings and the amino acid alignments using the BLOSUM62 cost matrix. The primers used to determine the linkage of *optrA-fexA* are listed in the Supplementary Table S1.

Table 1. Characterization of 13 clinical linezolid-resistant *E. faecalis* isolates investigated in this study.

| Isolate | Hospital 1 | Year | Type of Sample | MLST/CC | Linezolid MIC (mg/L) | Mechanisms of Linezolid Resistance 2 | Antimicrobial Resistance Phenotype 3 | Antimicrobial Resistance Genotype | Virulence Genes |
|---------|------------|------|-------------------|-----------|----------------------|--|---|--|--|
| C9884 | HSJ | 2017 | Urine | ST585/CC4 | 16 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ⁴ -LEV | <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> | <i>gelE</i> , <i>ace</i> , <i>agg</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpC</i> , <i>fsrB</i> , <i>tpx</i> |
| C8946 | HUG | 2017 | Leg wound exudate | ST480 | 16 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ^{4,5} -LEV | <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> | <i>hylA</i> , <i>ace</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpB</i> , <i>tpx</i> |
| C9901 | HUG | 2017 | Urine | ST21/CC21 | 16 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ | <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | <i>gelE</i> , <i>hylA</i> , <i>hylB</i> , <i>ace</i> , <i>agg</i> , <i>cylL</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpC</i> , <i>fsrB</i> , <i>tpx</i> |
| C9951 | HSP | 2017 | Urine | ST16 | 8 | <i>optrA</i> (Y176D, T481P); 23S rDNA (G2576T) | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT | <i>erm(A)</i> -like, <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> | <i>ace</i> , <i>agg</i> , <i>cylA</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpC</i> , <i>tpx</i> |
| C9952 | HSP | 2017 | Urine | ST35 | 8 | <i>optrA</i> (Y176D, T481P) | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-CIP ^{4,6} -LEV | <i>erm(A)</i> -like, <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> | <i>gelE</i> , <i>hylB</i> , <i>ace</i> , <i>cylA</i> , <i>cylL</i> , <i>cylM</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpB</i> , <i>fsrB</i> , <i>tpx</i> |
| C9736 | HVC | 2017 | Urine | ST585/CC4 | 16 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ⁴ -LEV | <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>str</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>dfrG</i> | <i>gelE</i> , <i>ace</i> , <i>agg</i> , <i>cylL</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpC</i> , <i>fsrB</i> , <i>tpx</i> |
| C9737 | HVC | 2017 | Urine | ST896 | 16 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-CIP ^{4,5} -LEV | <i>erm(B)</i> , <i>lnu(B)</i> , <i>lsa(A)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aph(3'')-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>optrA</i> , <i>fexA</i> , <i>cat_{PC221}</i> | <i>esp</i> , <i>gelE</i> , <i>hylA</i> , <i>hylB</i> , <i>ace</i> , <i>agg</i> , <i>efaAfs</i> , <i>elrA</i> , <i>srtA</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>cad</i> , <i>camE</i> , <i>ebpA</i> , <i>ebpB</i> , <i>tpx</i> |

Table 1. Cont.

| Isolate | Hospital 1 | Year | Type of Sample | MLST/CC | Linezolid MIC (mg/L) | Mechanisms of Linezolid Resistance 2 | Antimicrobial Resistance Phenotype 3 | Antimicrobial Resistance Genotype | Virulence Genes |
|---------|------------|------|----------------|-----------|----------------------|--------------------------------------|---|--|--|
| X523 | HVC | 2018 | Otic exudate | ST480 | 8 | <i>optrA</i> (T572P) | ERY-CLI-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ^{4,5} -LEV | <i>lsa(A), lsa(E), tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | <i>hylA, ace, efaAfs, elrA, srtA, ccf, cob, cad, camE, ebpA, ebpB, tpx</i> |
| X524 | HVC | 2018 | Urine | ST480 | 8 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ^{4,5} -LEV | <i>erm(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | <i>hylA, ace, agg, cylL, cylM, efaAfs, elrA, srtA, ccf, cob, cad, camE, ebpA, ebpB, tpx</i> |
| X525 | HVC | 2018 | Ulcer | ST585/CC4 | 8 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ⁴ -LEV | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(3'')-III, ant(6)-Ia, str, tet(M), tet(L), optrA, fexA, catA, dfrG</i> | <i>gelE, ace, agg, cylL, efaAfs, elrA, srtA, cob, cad, camE, ebpA, ebpC, fsrB, tpx</i> |
| X526 | HVC | 2018 | Urine | ST896 | 4 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-CIP ^{4,5} -LEV | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), optrA, fexA, cat_{pC221}</i> | <i>gelE, hylA, hylB, ace, cylA, cylL, efaAfs, elrA, srtA, ccf, cob, cad, camE, ebpA, ebpB, fsrB, tpx</i> |
| X527 | HVC | 2018 | Ulcer | ST6/CC2 | 16 | <i>optrA</i> | ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-CIP ^{4,5} -LEV | <i>erm(B), lsa(A), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), optrA, fexA</i> | <i>gelE, hylA, hylB, ace, agg, efaAfs, elrA, srtA, cob, cad, camE, ebpA, ebpB, ebpC, fsrB, tpx</i> |
| X528 | HVC | 2018 | Abscess | ST480 | 16 | <i>optrA; cfr(D)</i> | ERY-CLI-KAN-STR-TET-CHL-FFC-LZD-TDZ-SXT-CIP ^{4,5} -LEV | <i>erm(B), lsa(A), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), cfr(D), optrA, fexA, dfrG</i> | <i>hylA, ace, agg, efaAfs, elrA, srtA, ccf, cob, cad, camE, ebpA, ebpB, tpx</i> |

¹ HSJ, Hospital San Jorge; HUG, Hospital Universitario de Getafe; HSP, Hospital San Pedro; HVC, Hospital Verge de la Cinta; ² In brackets the mutations or amino acid changes detected; ³ ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; CHL, chloramphenicol; FFC, florfenicol; LZD, linezolid; TDZ, tedizolid; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim-; ⁴ Amino acid change S80I in the ParC protein; ⁵ Amino acid change S83Y in the GyrA protein; ⁶ Amino acid change S83I in the GyrA protein.

Table 2. Characterization of the six clinical linezolid-resistant *E. faecium* isolates investigated in this study.

| Isolate | Hospital 1 | Year | Type of Sample | PFGE Pattern | MLST | LZD MIC (mg/L) | Mechanisms of LZD Resistance 2 | Antimicrobial Resistance Phenotype 3 | Antimicrobial Resistance Genotype 4 | Virulence Genes |
|---------|------------|------|----------------|--------------|-------|----------------|--------------------------------|---|--|-------------------------|
| C9902 | HLB | 2017 | Abscess | A | ST17 | 8 | 23S rDNA (G2576T) | PEN ⁵ -AMP-ERY-CLI-KAN-STR-CIP ⁸ -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msrC</i> , <i>aac(6′)-Ii</i> , <i>aph(3′′)-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>dfrG</i> | <i>esp</i> , <i>hyl</i> |
| C9903 | HLB | 2017 | Surgical wound | B | ST262 | 16 | 23S rDNA (G2576T) | PEN ⁵ -AMP-ERY-CLI-GEN-KAN-STR-TET-CIP ⁸ -LEV-LZD-SXT | <i>msr(C)</i> , <i>lsa(E)</i> , <i>aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia</i> , <i>aac(6′)-Ii</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>dfrG</i> | |
| C10262 | HLB | 2017 | Blood | C | ST117 | 32 | 23S rDNA (G2576T) | PEN ⁶ -AMP-ERY-CLI-KAN-STR-CIP ⁸ -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>aac(6′)-Ii</i> , <i>aph(3′′)-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>dfrG</i> | <i>esp</i> , <i>hyl</i> |
| C9950 | HSP | 2017 | Blood | D | ST117 | 4 | 23S rDNA (G2576T) | PEN ⁷ -AMP-ERY-CLI-KAN-STR-CIP ⁸ -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>aac(6′)-Ii</i> , <i>aph(3′′)-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>dfrG</i> | <i>esp</i> , <i>hyl</i> |
| C9953 | HSP | 2017 | Urine | E | ST117 | 16 | 23S rDNA (G2576T) | PEN ^{1,5} -AMP-ERY-CLI-KAN-STR-CIP ⁸ -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>aac(6′)-Ii</i> , <i>aph(3′′)-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>dfrG</i> | <i>hyl</i> |
| C10269 | HRV | 2017 | Surgical wound | F | ST117 | 16 | 23S rDNA (G2576T) | PEN ⁶ -AMP-ERY-CLI-KAN-STR-CIP ⁸ -LEV-LZD-SXT | <i>erm(B)</i> , <i>msr(C)</i> , <i>aac(6′)-Ii</i> , <i>aph(3′′)-III</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>dfrG</i> | <i>esp</i> , <i>hyl</i> |

¹ HLB, Hospital Lozano Blesa; HSP, Hospital San Pedro; HRV, Hospital Royo Villanova;² In brackets the mutations detected; ³ PEN, penicillin; AMP, ampicillin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; LZD, linezolid; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole. I, intermediate; ⁴ The *msrC* and *aac(6′)-Ii* resistance genes are intrinsic to *E. faecium*; ⁵ Amino acid changes detected in the penicillin binding protein 5 (PBP5): G66E, A68T, E85D, E100Q, K144Q, T172A, L177I, D204G, A216S, T324A, V462A, insertion 466S, M485A, N496K, A499T, E525D, N546T, A558T, G582S, E629V, K632Q, P642L, D644N, and P667S; ⁶ Amino acid changes detected in the PBP5: G66E, A68T, E85D, E100Q, K144Q, T172A, L177I, D204G, A216S, T324A, insertion 466S, M485A, N496K, F497I, A499T, E525D, N546T, A558T, G582S, E629V, K632Q, P642L, D644N, and P667S; ⁷ Amino acid changes detected in the PBP5: G66E, E85D, E100Q, K144Q, T172A, L177I, D204G, A216S, T324A, V462A, insertion 466S, M485A, N496K, A499T, E525D, N546T, A558T, G582S, E629V, K632Q, P642L, D644N, and P667S; ⁸ Amino acid change S80I and S83Y in the ParC and the GyrA proteins, respectively.

LREfm isolates were characterized by PCR and subsequent amplicon sequencing, when applicable. On the basis of the antimicrobial resistance phenotype, the presence of the antimicrobial resistance genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(C)*, *lnu(B)*, *lsa(A)*, *lsa(B)*, *lsa(E)*, *aac(6′)-Ii*, *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia*, *aph(3′′)*, *ant(6)-Ia*, *str*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *fexA*, *fexB*, *cat_{pC194}*, *cat_{pC221}*, *cat_{pC223}*, *catA*, *dfrA*, *dfrD*, *dfrG*, and *dfrK* was tested by PCR (Supplementary Table S1). PCR and amplicon sequencing were used to detect mutations that led to amino acid changes in the GyrA and ParC proteins of fluoroquinolone-resistant isolates and in the penicillin binding protein 5 (PBP5) of those isolates that were classified as resistant or intermediate to β -lactam antibiotics (Supplementary Table S1). The obtained sequences were compared with those of the reference strain *E. faecium* DO. The isolates were subjected to Multilocus Sequence Typing (MLST) following standard methodology (Supplementary Table S1). The presence of the virulence genes coding for enterococcal surface protein (*esp*), hyaluronidase (*hyl*), gelatinase (*gelE*), adhesin to collagen (*ace*) from Efs, and aggregation substances (*agg*) were checked by PCR (Supplementary Table S1).

2.5. Clonal Relatedness

CSI Phylogeny 1.4 [29] with default parameters, was used to map the genomes of the 13 LREfs isolates against the *E. faecalis* ATCC[®] 29212 to infer a phylogeny-based analysis on the concatenated alignment of the high quality single nucleotide polymorphisms (SNPs). A maximum likelihood tree was constructed using FastTree 2.1.7 [29] (Lawrence Berkeley National Lab, CA, USA).

The clonal relatedness of Efm isolates was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of total DNA restricted with the enzyme *Sma*I, as previously described [30]. For classification of Efm as different clones, the criteria of Tenover et al. [31] were followed.

2.6. Conjugation Assays

Conjugation experiments were performed with all Efs isolates as donors to evaluate the transferability of the linezolid resistance genes by the filter-mating method [32]. *E. faecalis* JH2-2, which belongs to the sequence type ST8, was used as recipient strain and the selection of transconjugants was performed on BHI agar plates containing 10 mg/L florfenicol, 100 mg/L rifampicin, and 25 mg/L fusidic acid. Transconjugants were confirmed by MLST (Supplementary Table S1). The MICs of the transconjugants for different antimicrobial agents were determined by broth macrodilution using *S. aureus* ATCC[®] 29213 and *E. faecalis* ATCC[®] 29212 as quality controls, and by E-test[®] [21]. The respective antimicrobial resistance genotype was investigated by PCR (Supplementary Table S1).

3. Results

3.1. Mechanisms of Oxazolidinone Resistance

The characteristics of the 13 LREfs isolates are shown in Table 1. The sources of LREfs varied but eight out of 13 isolates (62%) originated from urine samples. LREfs displayed linezolid MICs between 4–16 mg/L and all of them showed tedizolid resistance (MICs 1 mg/L). The *optrA* gene was identified in all Efs isolates (n = 13), and the X528 isolate also harbored the *cfr(D)* gene. Moreover, the nucleotide point mutation G2576T within domain V of the 23S rDNA gene was detected in one *optrA*-positive isolate. In addition, the X523 and X524 *optrA*-carrying isolates showed mutations that account for the amino acid change V109A or A114V in the ribosomal protein L4, respectively (not associated to linezolid resistance). The amino acid alignment of the deduced OptrA sequences determined in this study with the wild-type OptrA protein originally described in *E. faecalis* E349 (GenBank accession number KP399637), revealed the presence of different variants: wild-type (n = 10), Y176D and T481P (n = 2), as well as T572P (n = 1) (Table 1). The Cfr(D) of Efs X528 showed 100% amino acid identity to that of *E. faecium* 15-307-1 (GenBank accession number MG707078). Neither *cfr*, *cfr(B)*, nor *poxA* genes were detected among the LREfs.

The six LREfm isolates were recovered from surgical wounds (n = 2), blood (n = 2), urine (n = 1), and an abscess (n = 1) (Table 2). The MICs to linezolid ranged from 4 to 32 mg/L. In the LREfm isolates, the mutation G2576T in 23S rDNA was detected in all isolates (Table 2). Moreover, the C9902 and C10269 isolates showed the amino acid change A35T in the ribosomal protein L22 (not associated to linezolid resistance). The transferable linezolid resistance genes *optrA*, *poxtA*, *cfr*, *cfr(B)*, and *cfr(D)* were not detected among the LREfm isolates.

3.2. Molecular Characterization and Clonal Relatedness

The 13 LREfs isolates belonged to the sequence types ST480 (n = 4), ST585 (n = 3), ST6 (n = 1), ST16 (n = 1), ST21 (n = 1), and ST35 (n = 1) and to the novel sequence type ST896 (n = 2) (Table 1). The Figure S2 shows the phylogenetic relatedness of the 13 Efs isolates based on the SNPs analysis. The minimum and maximum SNPs difference detected were 11 and 16567, respectively. The isolates C9737 and X526, that belonged to the novel ST896 and were recovered from the same hospital, were those that showed the minimum SNPs difference and were grouped in one phylogenetic cluster very distantly from the rest. The isolates belonging to the ST480 and ST585 were grouped in two phylogenetic clusters in accordance with their STs (Figure S2).

In the case of the LREfm, four out of six isolates were assigned to ST117, and the others to ST17 or ST262 (Table 2). The PFGE fragment patterns revealed that all six isolates belonged to different clones (A to F) (Figure S3).

3.3. Resistance to Non-Oxazolidinone Agents

All LRE showed a multidrug resistance phenotype (resistant to three or more classes of antimicrobial agents), but were susceptible to vancomycin, teicoplanin and daptomycin, among others (Tables 1 and 2). All LREfm showed penicillin and ampicillin resistance and exhibited several amino acid changes in the deduced sequence of the PBP5 (Table 2). All LRE displayed resistance to macrolides and lincosamides with the detection of different combinations of the resistance genes *erm(A)*, *erm(B)*, *msr(C)*, *lnu(B)*, *lsa(A)*, and *lsa(E)*. High-level resistance to at least one aminoglycoside was detected in 12 LREfs and in all LREfm, mediated by the resistance genes *aac(6′)-aph(2′′)*, *aac(6′)-Ii*, *aph(3′)-III*, *ant(6)-Ia*, and/or *str*. Tetracycline resistance was found in all LREfs isolates and in one LREfm isolate mediated by *tet(L)*, *tet(M)*, and/or *tet(O)* genes. The analysis of the WGS and the PCR-amplicon sequencing results revealed the presence of amino acid changes in the GyrA (S83Y or S83I) and/or ParC (S80I) proteins in fluoroquinolone-resistant isolates (11 LREfs and all LREfm). All LREfs isolates showed resistance to florfenicol (MICs 32–64 mg/L) and chloramphenicol (MICs 32–128 mg/L) and harbored the *flexA* gene, but were negative for the *flexB* gene. The *catA* and *cat_{PC221}* genes were also detected among LREfs. All LREfm, in contrast, showed susceptibility to chloramphenicol and florfenicol. Eight LREfs and all LREfm isolates harbored the trimethoprim resistance gene *dfrG* and these isolates were also classified as resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim (Tables 1 and 2).

3.4. Virulence Profile

In total, 22 different virulence genes were detected among the LRE isolates, including those implicated in biofilm formation, bacterial adherence, and production of cytolytic enzymes, among others (Tables 1 and 2). Ten of these virulence genes (*ace*, *efaAfs*, *elrA*, *srtA*, *ccf*, *cob*, *cad*, *camE*, *ebpA*, and *tpx*) were detected in all LREfs. The gene for the *Enterococcus* surface protein, *esp*, was present in one LREfs and four LREfm isolates. One LREfm isolate did not contain any of the virulence genes studied (Tables 1 and 2).

3.5. Genetic Environment of the *optrA* and *cfr(D)* Genes

The nucleotide sequence alignment of the genetic environment of the linezolid resistance gene *optrA* in the 13 LREfs isolates is shown in Figure 1. The genetic context showed different degrees of nucleotide sequence identity with one another although in some isolates the *optrA* flanking sequences

could only be partially identified due to the contig length. The region upstream of the *optrA* gene showed high sequence similarity in the isolates C9901 (GenBank accession number MN848142), X527, X528, C9952 (GenBank accession number MN731744), C8946, C9736, and C9884 although they were recovered from different hospitals. In the isolates C9901, X527, X528, and C9952, the *tnp* gene encoding an ISL3 family transposase and the *impB* gene which is involved in DNA repair, were detected upstream of the *optrA* gene. In the case of isolate X526 (GenBank accession number MN731743), one site-specific recombinase gene was identified. The *fexA* gene, which confers resistance to fluorinated and non-fluorinated phenicols, was detected upstream of the *optrA* gene in 12 isolates, although in the isolates X523 and C9737 it could not be totally revealed because of incomplete sequencing with the primers used. Moreover, an *erm(A)*-like gene was located downstream of the *optrA* gene in two isolates recovered from the same hospital. This *erm(A)*-like gene showed 100% nucleotide identity to that detected in the *optrA* gene cluster of plasmid p10-2-2 of *E. faecalis* strain 10-2-2 (GenBank accession number KT862775) [33]. We did not identify any *rep* gene or insertion sequence elements (ISs) in the genetic context of the *optrA* gene in the 13 LREfs investigated.

Regarding the *cfr(D)* gene, we could identify the presence of a *guaA* gene encoding a glutamine-hydrolyzing guanosine monophosphate synthase in the downstream region. Upstream of the *cfr(D)* gene, due to the short sequence length, we could only detect three reading frames for proteins with unknown function. The 4545 bp of the genetic environment of the *cfr(D)* gene revealed 100% nucleotide identity to that of plasmid 4 of *E. faecium* E8014 (GenBank accession number LR135354).

3.6. Transferability of the *optrA* and *cfr(D)* Genes

The *optrA* gene was successfully transferred by conjugation to *E. faecalis* JH2-2 in 12 out of the 13 isolates. The single isolate for which the *optrA* gene was not transferred was the isolate C8946. The *optrA* gene was transferred in all cases together with the *fexA* gene (Table 3). All transconjugants (TC) exhibited resistance to chloramphenicol (MICs 32–64 mg/L), florfenicol (MICs 32–64 mg/L), tedizolid (MICs 1 mg/L), and were classified as intermediate or resistant to linezolid (MICs 4–8 mg/L). Moreover, the transconjugants TC-C9951 and TC-C9952 showed resistance to erythromycin (MICs 128–256 mg/L) and clindamycin (MICs >256 mg/L) and harbored the *erm(A)*-like gene. In addition, TC-9951 was resistant to tetracycline and carried the resistance genes *tet(L)* and *tet(O)* (MIC 128 mg/L) (Table 3). The *cfr(D)* gene was not transferable.

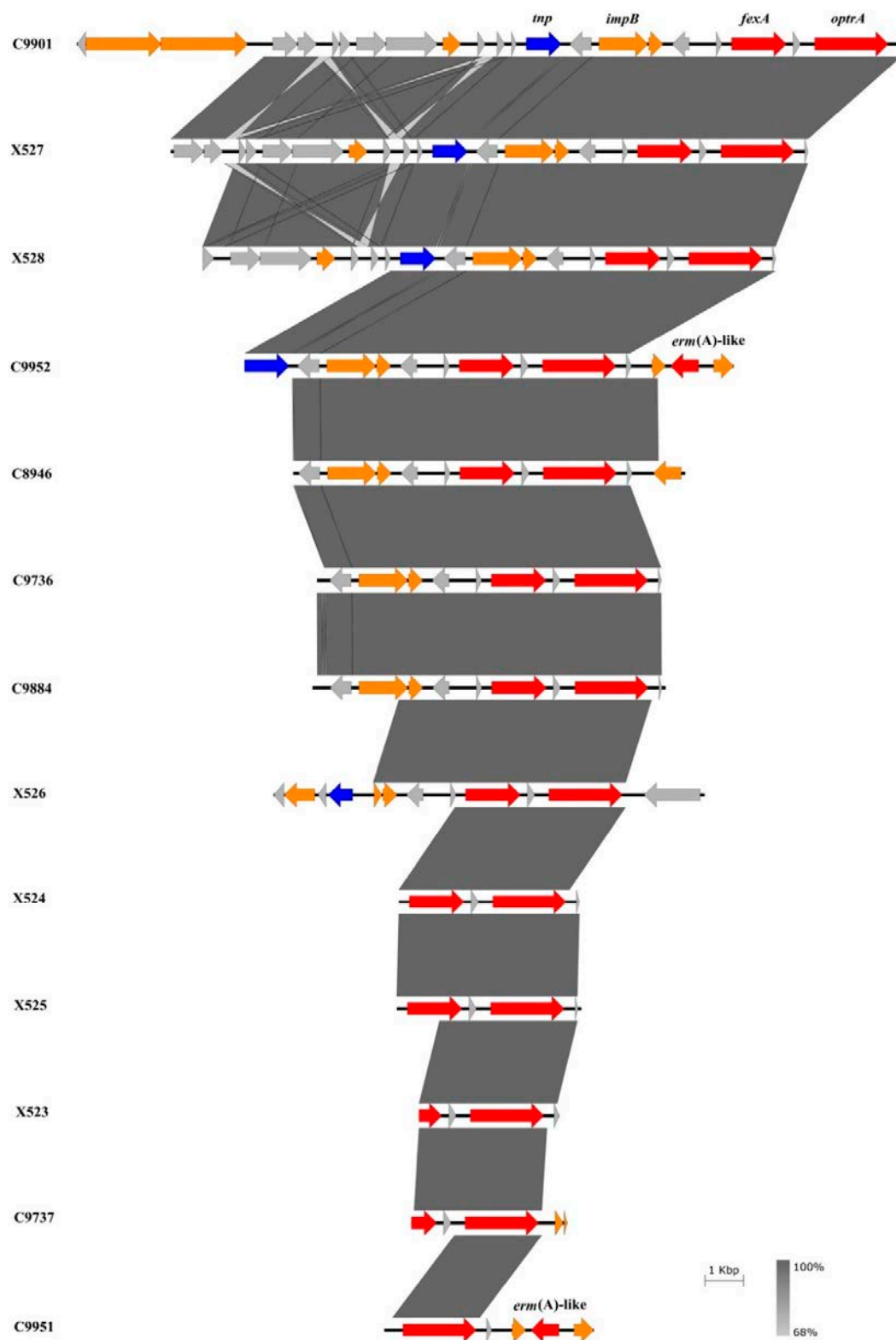


Figure 1. BLAST comparison of the genetic environment of the *optrA* gene in the 13 clinical LREfs isolates. Coding sequences (CDS) are colored according to their function: red, antimicrobial resistance; blue, recombination and transposition; orange, known function; grey, unknown function. The percentage of identity and scale bar legends are shown on the right.

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the recipient *E. faecalis* JH2-2, the *E. faecalis* donor strains, and the respective transconjugants.

| Strain | Genotype | MIC (mg/L) ¹ | | | | | | |
|--------------------------------------|--|-------------------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | ERY | CLI | TET | CHL | FFC | LZD | TDZ |
| <i>E. faecalis</i> JH2-2 (recipient) | - | 1 | 2 | 0.125 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> C9884 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, str, tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | >256 | 256 | 128 | 64 | 64 | 16 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-C9884 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> C9901 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), optrA, fexA</i> | >256 | >256 | >256 | 32 | 64 | 16 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-C9901 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> C9951 | <i>erm(A)-like, erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), tet(O), optrA, fexA, dfrG</i> | >256 | >256 | 128 | 64 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-C9951 | <i>erm(A)-like, tet(L), tet(O), optrA, fexA</i> | 256 | >256 | 128 | 64 | 64 | 4 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> C9952 | <i>erm(A)-like, erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), optrA, fexA</i> | 256 | >256 | >256 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-C9952 | <i>erm(A)-like, optrA, fexA</i> | 128 | >256 | 0.125 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> C9736 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, str, tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | >256 | 128 | 256 | 128 | 32 | 16 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-C9736 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 64 | 32 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> C9737 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), optrA, fexA, cat_{PC221}</i> | >256 | 128 | 128 | 32 | 64 | 16 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-C9737 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 32 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> X523 | <i>lsa(A), lsa(E), tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | 128 | >256 | 128 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-X523 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> X524 | <i>erm(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), optrA, fexA, dfrG</i> | 256 | 256 | 256 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-X524 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> X525 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, str, tet(M), tet(L), optrA, fexA, catA, dfrG</i> | >256 | 128 | 128 | 64 | 64 | 8 | 1 |

Table 3. Cont.

| Strain | Genotype | MIC (mg/L) ¹ | | | | | | |
|----------------------------|--|-------------------------|------|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | ERY | CLI | TET | CHL | FFC | LZD | TDZ |
| <i>E. faecalis</i> TC-X525 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 32 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> X526 | <i>erm(B), lnu(B), lsa(A), lsa(E), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), optrA, fexA, cat_{pC221}</i> | >256 | 128 | 128 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-X526 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 4 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> X527 | <i>erm(B), lsa(A), aac(6')-aph(2''), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), optrA, fexA</i> | >256 | 256 | 128 | 32 | 64 | 16 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-X527 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 8 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> X528 | <i>erm(B), lsa(A), aph(3'')-III, ant(6)-Ia, tet(M), tet(L), cfr(D), optrA, fexA, dfrG</i> | >256 | >256 | >256 | 32 | 64 | 16 | 1 |
| <i>E. faecalis</i> TC-X528 | <i>optrA, fexA</i> | 1 | 2 | 0.125 | 32 | 64 | 8 | 1 |

¹ ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; FFC, florfenicol; LZD, linezolid; TDZ, tedizolid; the genotypes of the transconjugants are displayed in bold.

4. Discussion

Since linezolid is a last resort antimicrobial agent in the treatment of serious infections caused by Gram-positive pathogens, linezolid resistance represents a great public health concern. Hence, it is very important to determine the mechanisms of this resistance in clinical isolates. The first description of LRE in Spain occurred in 2003, shortly after the introduction of this antimicrobial agent for clinical use in humans in 2001 in this country [34]. Since then, the occurrence of linezolid resistance among enterococci has increased considerably over recent years in Spain and worldwide [3,4,14,17–20,35,36]. Spreading linezolid resistance is not only a problem in the clinical setting but it has also become a concern in the livestock environment caused by the presence of transferable linezolid resistance genes [1,4,14,33]. Traditionally, mutations in domain V of 23S rDNA have been considered as the main mechanism involved in linezolid resistance among clinical isolates [1,3–5]. However, this study and other previous findings have demonstrated changes in the mechanisms of linezolid resistance in the clinical setting [14,18–20,36–42].

In this work, linezolid resistance was detected in the species *E. faecalis* and *E. faecium*. This could be expected since they are the most common enterococcal species related to hospital-associated infections [1,4,5]. However, in the clinical setting, previous studies reported the presence of linezolid resistance in other enterococcal species such as *E. thailandicus*, *E. gallinarum*, and *E. avium* [31,34]. The *optrA* and *cfr(D)* genes were the only linezolid resistance genes detected in our study, although the *cfr*, *cfr(B)*, and *poxA* genes have been previously detected in Efs and/or Efm of clinical origin [10,16,41]. In Spain, a recent study conducted among clinical LRE of different hospitals revealed a high prevalence of the *optrA* gene among LREfs isolates and the presence of two *poxA*-carrying isolates, while *cfr*-like genes were absent [37].

The *optrA* gene is widely spread among enterococci in different countries, but especially present in China [14,18,19,38–42]. In the case of Spain, more than the 80% of LREfs isolates recovered from Spanish hospitals during 2015–2018 carried the *optrA* gene [37]. Generally, the *optrA* gene confers relatively low MICs to linezolid (4–16 mg/L) [14,17–19,35,36,38–42], which is in agreement with our results. So far, numerous variants of the *optrA* gene have been described in Efs and Efm from humans, animals, and food items and some of these variants seemed to be associated with higher or lower linezolid MICs [43,44]. In this study, the amino acid changes Y176D and T481P in Optra, DP (aspartic acid-proline) variant, were detected in two Efs isolates. This variant has already been described in

clinical isolates from China [18,38,43,44]. However, one isolate showed a novel amino acid change in *Optra* at position T572P.

In this study, we report, to the best of our knowledge, the first description of the *cfr(D)* gene in the species *E. faecalis*. The *Cfr(D)* shares 64% amino acid identity to *Cfr*, but there is controversy about its contribution to linezolid resistance, as it confers a PhLOPS_A resistance phenotype when expressed in *Escherichia coli* but not in *Efs* or *Efm* [11]. The *cfr(D)* gene has only been detected in clinical *Efm* isolates from France and Australia, and, as the isolate of this study, they co-harbored the *optra* gene [11,45].

The G2576T mutation in the 23S rDNA is the main mechanism implicated in linezolid resistance of *Efm* isolates investigated in this study, which is in accordance with previous findings [3,19,35,37]. A low rate of amino acid changes in the ribosomal proteins has been observed among LRE in this study, which is consistent with previous studies which observed that these are more commonly found among clinical coagulase-negative staphylococci than in *S. aureus* or enterococci [3]. As far as we know, the amino acid changes detected in the ribosomal proteins L4 (V109A and A114V) and L22 (A35T) in this study have not been reported in LRE. Different amino acid changes in these ribosomal proteins have been previously described in linezolid-susceptible strains [3,42], so it is questionable whether the mutations detected in this study are associated with decreased susceptibility to linezolid; for this reason, these amino acid changes have not been included in Tables 1 and 2.

In this study, LRE_{efs} isolates belonged to seven different STs, but the predominance (eight out of 13 isolates) of isolates typed as ST480, ST585, or ST16 is in accordance with prior studies among clinical *optra*-positive LRE_{efs} in Spain [37] and worldwide [14,20,40]. However, we did not detect the ST116, which is also frequently found among *optra*-positive *Efs* of different origins [14,40]. Regarding *Efm*, all isolates were assigned to the hospital-associated subclade A1, which is the most important genogroup among *Efm* related to clinical infections and responsible for hospital outbreaks worldwide [46]. *Efm* isolates belonging to this subclade recovered from both humans and livestock have been previously reported as carrying the *optra* gene [14,37].

The multiresistance phenotypes and genotypes observed are commonly seen among LRE [35,40]. Fortunately, all isolates in our study were susceptible to daptomycin and vancomycin, which would be considered as alternative antimicrobial options. The resistance rates to macrolides and lincosamides (100%), as well as fluoroquinolones (89%), detected in this study were very high, which is in accordance with previous studies among clinical LRE [35,40]. As reported by other authors for clinical LRE [30,36], the examined isolates harbored various virulence genes of great importance for the pathogenesis of enterococci. Many of these virulence determinants, such as the collagen binding protein Ace and the pilus protein EbpA, are shared by all isolates and seem to be generally widespread among LRE_{efs} of clinical origin [36,40]. The *esp* gene is one of the most important enterococcal virulence genes, which contributes to the colonization and persistence of enterococcal infections and is frequently detected among isolates recovered from human infections. Moreover, four out of six LRE_{efm} isolates carried the virulence gene *esp*, which is known to be located on a putative pathogenicity island that is present in the majority of *Efm* isolates belonging to the subclade A1 [46].

The *optra* gene was confirmed to have a great capacity to disseminate among different Gram-positive bacteria [14]. It is often located on conjugative plasmids that commonly carry other antimicrobial resistance genes and is frequently found in combination with the *fexA* gene [14,33,37,44]. Likewise, when *optra* is located in the chromosomal DNA, the *fexA* gene is often identified in its genetic environment [20,23,37,44]. In 12 out of 13 LRE_{efs} isolates of our study, the *fexA* gene was located upstream of *optra*. The remaining *Efs* isolate also carried the *fexA* gene but the sequenced genetic environment of *optra* did not cover the possible presence or absence of *fexA*. When located on plasmids, the insertion sequence IS1216E was frequently identified upstream and/or downstream of the *optra* gene [33,36,37,44], however, we did not detect this IS1216E element. Moreover, we also did not detect the putative transcriptional regulator *araC* commonly located just upstream the *optra* gene [33,43,44] when located in the chromosomal DNA. The *impB* and *tnp* genes, both detected in four LRE_{efs} isolates, are commonly found as part of the *optra* gene cluster of different plasmids, such as in *E. faecalis* strain

XY17 plasmid pXY17 (GenBank accession number KT862780) [33]. The antimicrobial susceptibility of the transconjugants is in accordance with the resistance genotype detected. The transferability of the *optrA* gene together with other antimicrobial resistance genes in 12 LREfs isolates suggests its possible plasmid location; however, additional experiments would be required to confirm this point. Besides *optrA*, the *erm(A)*-like gene was detected in the transconjugants TC-9951 and TC-9952, which was expected, since it was located downstream of *optrA* in both isolates. The *tet(L)* and *tet(O)* genes were transferred together with *optrA*, *fexA*, and the *erm(A)*-like gene in the case of TC-C9951. These tetracycline resistance genes were detected on the same contig, which was identical—as well as the contigs containing *optrA*, *fexA*, and *erm(A)* genes—to the respective parts of *Enterococcaceae* strain E508 plasmid pE508 (GenBank accession number MK425645). This observation suggests that these five resistance genes could be located on the same plasmid.

Although the co-transferability of the *optrA* and *cfr(D)* genes by conjugation has been previously described in the species *E. faecium* [11], in this work the *cfr(D)* gene was not transferable.

5. Conclusions

In conclusion, we have shown that the main mechanism involved in linezolid resistance among clinical LREfs is conferred by the *optrA* gene, whereas in LREfm the presence of mutations in the domain V of the 23S rDNA is the major cause for linezolid resistance. Moreover, we report the first detection of the *cfr(D)* gene in Efs. Some of the most important virulence factors of *Enterococcus* spp. were detected among LRE, which, if coupled with the multidrug resistance phenotype, is a public health concern.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1155/s1>. Table S1: Primer pairs used for the molecular typing, and the detection of antimicrobial resistance and virulence genes. Figure S1: Location of the six Spanish hospitals that took part in this study. Figure S2: Phylogenetic relatedness of the 13 *E. faecalis* isolates based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis performed using CSI Phylogeny. Figure S3: Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of whole-cell DNA of *E. faecium* isolates after digestion with the enzyme *SmaI*.

Author Contributions: C.T. and S.S. designed the study, performed its supervision, and obtained the funding; L.R.-R., A.T.F., D.H., and I.E. performed the experiments and analyzed the data. J.M.A.-G., M.O.P.-M., C.S., C.A., C.A.A., L.T., and J.-I.A. isolated the clinical strains. All authors drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by project SAF2016-76571-R from the Agencia Estatal de Investigación (AEI) of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) of EU and the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under project number 01KI1727D as part of the Research Network Zoonotic Infectious Diseases. Laura Ruiz-Ripa has a pre-doctoral fellowship from the Universidad de La Rioja.

Acknowledgments: Part of this work was presented at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Madrid, April 2018.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Torres, C.; Alonso, C.A.; Ruiz-Ripa, L.; León-Sampedro, R.; Del Campo, R.; Coque, T.M. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*, 185–227. [CrossRef]
2. Batts, D.H. Linezolid—A new option for treating gram-positive infections. *Oncology* **2000**, *14*, 23–29. [PubMed]
3. Mendes, R.E.; Deshpande, L.M.; Jones, R.N. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* **2014**, *17*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
4. Bi, R.; Qin, T.; Fan, W.; Ma, P.; Gu, B. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2018**, *13*, 11–19. [CrossRef]
5. Miller, W.R.; Munita, J.M.; Arias, C.A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2014**, *12*, 1221–1236. [CrossRef]

6. Kehrenberg, C.; Schwarz, S.; Jacobsen, L.; Hansen, L.H.; Vester, B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: Methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 1064–1073. [[CrossRef](#)]
7. Schwarz, S.; Werckenthin, C.; Kehrenberg, C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2530–2533. [[CrossRef](#)]
8. Shen, J.; Wang, Y.; Schwarz, S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1697–1706. [[CrossRef](#)]
9. Deshpande, L.M.; Ashcraft, D.S.; Kahn, H.P.; Pankey, G.; Jones, R.N.; Farrell, D.J.; Mendes, R.E. Detection of a new *cfr*-like gene, *cfr* (B), in *Enterococcus faecium* isolates recovered from human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6256–6261. [[CrossRef](#)]
10. Kuroda, M.; Sekizuka, T.; Matsui, H.; Suzuki, K.; Seki, H.; Saito, M.; Hanaki, H. Complete genome sequence and characterization of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate KUB3006 carrying a *cfr* (B)-transposon on its chromosome and *optrA*-plasmid. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2576. [[CrossRef](#)]
11. Guerin, F.; Sassi, M.; Dejoies, L.; Zouari, A.; Schutz, S.; Potrel, S.; Auzou, M.; Collet, A.; Lecointe, D.; Auger, G.; et al. Molecular and functional analysis of the novel *cfr* (D) linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 1699–1703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bender, J.K.; Fleige, C.; Klare, I.; Fiedler, S.; Mischnik, A.; Mutters, N.T.; Dingle, K.E.; Werner, G. Detection of a *cfr*(B) variant in German *Enterococcus faecium* clinical isolates and the impact on linezolid resistance in *Enterococcus* spp. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0167042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sharkey, L.K.; Edwards, T.A.; O'Neill, A.J. ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *mBio* **2016**, *7*, e01975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wang, Y.; Lv, Y.; Cai, J.; Schwarz, S.; Cui, L.; Hun, Z.; Zhang, R.; Li, J.; Zhao, Q.; He, T.; et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 2182–2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Antonelli, A.; D'Andrea, M.M.; Brenciani, A.; Galeotti, C.L.; Morroni, G.; Pollini, S.; Varaldo, P.E.; Rossolini, G.M. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1763–1769. [[CrossRef](#)]
16. Papagiannitsis, C.C.; Tsilipounidaki, K.; Malli, E.; Petinaki, E. Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxtA*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 2461–2462. [[CrossRef](#)]
17. Mendes, R.E.; Deshpande, L.; Streit, J.M.; Sader, H.S.; Castanheira, M.; Hogan, P.A.; Flamm, R.K. ZAAPS programme results for 2016: An activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1880–1887. [[CrossRef](#)]
18. Cui, L.; Wang, Y.; Lv, Y.; Wang, S.; Song, Y.; Li, Y.; Liu, J.; Xue, F.; Yang, W.; Zhang, J. Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 7490–7493. [[CrossRef](#)]
19. Deshpande, L.M.; Castanheira, M.; Flamm, R.K.; Mendes, R.E. Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 2314–2322. [[CrossRef](#)]
20. Sassi, M.; Guérin, F.; Zouari, A.; Beyrouthy, R.; Auzou, M.; Fines-Guyon, M.; Potrel, S.; Dejoies, L.; Collet, A.; Boukthir, S.; et al. Emergence of *optrA*-mediated linezolid resistance in enterococci from France, 2006–2016. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1469–1472. [[CrossRef](#)]
21. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI Supplement M100*, 28th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
22. EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version*, 8th ed.; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Växjö, Sweden, 2018.
23. Hong, T.; Li, X.; Wang, J.; Sloan, C.; Cicogna, C. Sequential linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates with G2576T mutation. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 3277–3280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Joensen, K.G.; Scheutz, F.; Lund, O.; Hasman, H.; Kaas, R.S.; Nielsen, E.M.; Aarestrup, F.M. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1501–1510. [[CrossRef](#)]
27. Larsen, M.V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R.L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D.W.; Aarestrup, F.M.; et al. Multilocus sequence typing of total genome sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1355–1361. [[CrossRef](#)]
28. Siguier, P.; Perochon, J.; Lestrade, L.; Mahillon, J.; Chandler, M. ISfinder: The Reference Centre for Bacterial Insertion Sequences. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D32–D36. [[CrossRef](#)]
29. Kaas, R.S.; Leekitchaenphon, P.; Aarestrup, F.M.; Lund, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104984. [[CrossRef](#)]
30. López, M.; Alvarez-Martínez, M.J.; Marco, F.; Torres, C. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium*. Analysis of the resistance genotype, virulence and genetic Lines. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.* **2013**, *31*, 10–14. [[CrossRef](#)]
31. Tenover, F.C.; Arbet, 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*, 2233–2239. [[CrossRef](#)]
32. Dunny, G.M.; Craig, R.A.; Carron, R.L.; Clewell, D.B. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: Production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid* **1979**, *2*, 454–465. [[CrossRef](#)]
33. He, T.; Shen, Y.; Schwarz, S.; Cai, J.; Lv, Y.; Li, J.; Feßler, A.T.; Zhang, R.; Wu, C.; Shen, J.; et al. Genetic environment of the transferable oxazolidinone/phenicol resistance gene *optrA* in *Enterococcus faecalis* isolates of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 1466–1473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sánchez-Gómez, J.C.; Fraile-Malmierca, F.; Valverdé-Romero, E.D.; Sánchez, M.; García-Rodríguez, J.A.; García-Sánchez, J.E. Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*: First report in Spain. *J. Chemother.* **2006**, *18*, 440–442. [[CrossRef](#)]
35. Gawryszewska, I.; Żabicka, D.; Hryniewicz, W.; Sadowy, E. Linezolid-resistant enterococci in Polish hospitals: Species, clonality and determinants of linezolid resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *36*, 1279–1286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cámara, J.; Camoez, M.; Tubau, F.; Pujol, M.; Ayats, J.; Ardanuy, C.; Domínguez, M.Á. Detection of the novel *optrA* gene among linezolid-resistant enterococci in Barcelona, Spain. *Microb. Drug Resist.* **2019**, *25*, 87–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Moure, Z.; Lara, N.; Marín, M.; Sola-Campoy, P.J.; Bautista, V.; Gómez-Bertomeu, F.; Gómez-Domínguez, C.; Pérez-Vázquez, M.; Aracil, B.; Campos, J.; et al. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the *optrA* and *poxA* genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *21*, 105977. [[CrossRef](#)]
38. Cai, J.; Wang, Y.; Schwarz, S.; Lv, H.; Li, Y.; Liao, K.; Yu, S.; Zhao, K.; Gu, D.; Wang, X.; et al. Enterococcal isolates carrying the novel oxazolidinone resistance gene *optrA* from hospitals in Zhejiang, Guangdong, and Henan, China, 2010–2014. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 1095.e1–1095.e4. [[CrossRef](#)]
39. Lee, S.M.; Huh, H.J.; Song, D.J.; Shim, H.J.; Park, K.S.; Kang, C.I.; Ki, C.S.; Lee, N.Y. Resistance mechanisms of linezolid-nonsusceptible enterococci in Korea: Low rate of 23S rRNA mutations in *Enterococcus faecium*. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 1730–1735. [[CrossRef](#)]
40. Chen, M.; Pan, H.; Lou, Y.; Wu, Z.; Zhang, J.; Huang, Y.; Yu, W.; Qiu, Y. Epidemiological characteristics and genetic structure of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 2397–2409. [[CrossRef](#)]
41. Zhang, Y.; Dong, G.; Li, J.; Chen, L.; Liu, H.; Bi, W.; Lu, H.; Zhou, T. A high incidence and coexistence of multiresistance genes *cfr* and *optrA* among linezolid-resistant enterococci isolated from a teaching hospital in Wenzhou, China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *37*, 1441–1448. [[CrossRef](#)]
42. Hua, R.; Xia, Y.; Wu, W.; Yang, M.; Yan, J. Molecular epidemiology and mechanisms of 43 low-level linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* strains in Chongqing, China. *Ann. Lab. Med.* **2019**, *39*, 36–42. [[CrossRef](#)]

43. Cai, J.; Schwarz, S.; Chi, D.; Wang, Z.; Zhang, R.; Wang, Y. Faecal carriage of *optrA*-positive enterococci in asymptomatic healthy humans in Hangzhou, China. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 630.e1–630.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wu, Y.; Fan, R.; Wang, Y.; Lei, L.; Feßler, A.T.; Wang, Z.; Wu, C.; Schwarz, S.; Wang, Y. Analysis of combined resistance to oxazolidinones and phenicols among bacteria from dogs fed with raw meat/vegetables and the respective food items. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pang, S.; Boan, P.; Lee, T.; Gangatharan, S.; Tan, S.J.; Daley, D.; Lee, Y.T.; Coombs, G.W. Linezolid-resistant ST872 *Enterococcus faecium* harbouring *optrA* and *cfr* (D) oxazolidinone resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *55*, 105831. [[CrossRef](#)]
46. Lee, T.; Pang, S.; Abraham, S.; Coombs, G.W. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *16*, 36–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**