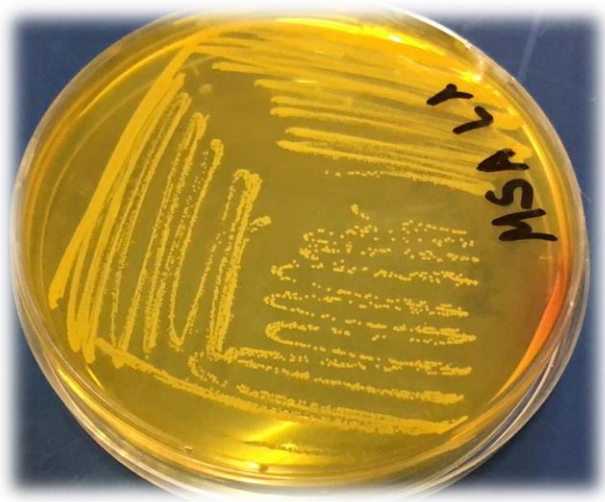


Epidemiología molecular de la resistencia a altos niveles de mupirocina en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Molecular epidemiology of high-level mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.



Trabajo de Fin de Grado

Lorelay Paz Rodríguez

Tutorizado por Eduardo Pérez Roth y Diego García
Martínez de Artola. Grado en Biología.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. Género <i>Staphylococcus</i>	2
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.1.2. <i>S. aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	3
1.2. Resistencia a mupirocina en <i>S. aureus</i>	4
1.2.1. Bases moleculares de la resistencia a altos niveles de mupirocina (Hi-Mup ^R)	5
1.2.2. Métodos de detección de la resistencia a mupirocina.	6
1.3. Tipificación molecular de <i>S. aureus</i> mediante MLVA.....	7
2. Objetivos	9
3. Materiales y Métodos	10
3.1. Periodo de estudio, aislados clínicos de <i>S. aureus</i> y otras cepas.....	10
3.1.1. Identificación y pruebas de sensibilidad antibiótica	10
3.2. Siembra y cultivo de microorganismos	11
3.2.1. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación.....	11
3.3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.	12
3.3.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR y secuenciación	12
3.3.1.1. PCR para la detección del gen <i>ileS2</i>	13
3.3.1.2. Amplificación simultánea de las regiones espaciadoras IS257- <i>ileS2</i>	14
3.3.1.3. Análisis y comparación de secuencias de ADN.....	15
3.3.2. Electroforesis convencional en geles de agarosa.....	16
3.3.3. Extracción del ADN plasmídico total.	15
3.3.4. Tipificación molecular mediante MLVA	16
3.4. Análisis estadísticos.	16
4. Resultados y Discusión	17
4.1. Aislados clínicos de <i>S. aureus</i> y sensibilidad antibiótica.	17
4.1.1. Asociación entre la Hi-Mup ^R y la resistencia a otros antibióticos.....	17
4.2. <i>S. aureus</i> Hi-Mup ^R seleccionados para su estudio.....	18
4.3. Correlación entre el fenotipo Hi-Mup ^R y la presencia del gen <i>ileS2</i>	21
4.4. Patrones de amplificación de las regiones espaciadoras IS257- <i>ileS2</i>	22
4.5. Tipos clonales (genotipos MLVA) de <i>S. aureus</i>	25
4.5.1. Distribución clonal de los elementos portadores del gen <i>ileS2</i>	26
5. Conclusiones	27
Conclusions	27
6. Bibliografía	28

Resumen

La mupirocina es un antibiótico empleado en el tratamiento de infecciones de la piel causadas por los estafilococos, y juega un papel clave en el control de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Sin embargo, la resistencia a altos niveles de mupirocina (Hi-Mup^R) se ha asociado al fracaso terapéutico. El gen *ileS2*, responsable de la Hi-Mup^R, se ubica generalmente en plásmidos capaces de transferirse horizontalmente entre bacterias. Habitualmente, éstos son portadores de otros genes de resistencia a antibióticos, y pueden ser adquiridos por clones epidémicos con gran capacidad de expansión. Así, tanto la diseminación clonal como la transferencia génica horizontal pueden contribuir en la dispersión de la Hi-Mup^R. El principal objetivo de este estudio fue conocer cómo se dispersa la Hi-Mup^R en una población de *S. aureus* en 2018 y su asociación con otras resistencias. Para ello, se realizó la caracterización y tipificación molecular de una muestra de aislados clínicos, y se inició el estudio de los elementos genéticos portadores del gen *ileS2*. Esto permitió concluir que tanto la diseminación clonal como la transferencia génica horizontal parecen haber contribuido al surgimiento y dispersión de la Hi-Mup^R en *S. aureus*.

Abstract

Mupirocin is an antibiotic used in the treatment of skin infections caused by staphylococci, and plays a key role in the control of nasal carriers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). However, high-level mupirocin resistance (Hi-Mup^R) has been associated with therapeutic failure. The *ileS2* gene, responsible for Hi-Mup^R, is generally located on plasmids capable of transferring horizontally between bacteria. Typically, these are carriers of other antibiotic resistance genes, and can be acquired by epidemic clones with great expandability. Thus, both clonal dissemination and horizontal gene transfer can contribute to the dispersion of Hi-Mup^R. The main objective of this study was to know how Hi-Mup^R is dispersed in a population of *S. aureus* in 2018 and its association with other resistances. To do this, the characterization and molecular typing of a sample of clinical isolates was performed, as well as the preliminary study of *ileS2*-carrying elements. This allowed us to conclude that both clonal dissemination and horizontal gene transfer appear to have contributed to the emergence and dispersion of Hi-Mup^R in *S. aureus*.

1. Introducción

1.1. Género *Staphylococcus*

Staphylococcus es un género de bacterias del filo Firmicutes pertenecientes a la familia Staphylococcaceae. Son cocos grampositivos, inmóviles y no esporulados de 0,15 a 1,5 μm de diámetro. El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que estos cocos grampositivos tienen tendencia a agruparse formando un patrón que recuerda a un racimo de uvas (Figura 1). Los estafilococos son poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. Pueden crecer en muy diversas condiciones ambientales, en presencia de una elevada concentración de sal y a temperaturas entre 18-40 $^{\circ}\text{C}$ (Murray *et al.*, 2015).

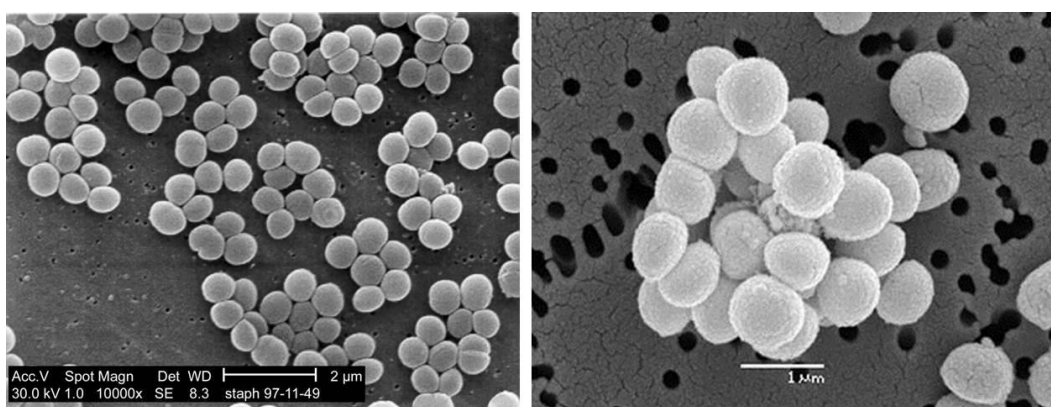


Fig.1. Micrografía electrónica de barrido de estafilococos. Organización en racimos del género *Staphylococcus* (Center for Disease Control and Prevention's Image Library).

Los estafilococos son colonizadores ubicuos en la piel y las mucosas del ser humano. Además, originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas, infecciones de la piel, partes blandas, los huesos y el aparato genitourinario. Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad son *Staphylococcus aureus*, (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, y *S. lugdunensis* (Foster *et al.*, 2017; Pérez-Roth *et al.*, 2006)

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es el patógeno más importante y mejor estudiado del género *Staphylococcus*. Los seres humanos constituyen el principal reservorio de *S. aureus* en la naturaleza. Las infecciones causadas por *S. aureus* son principalmente endógenas, la colonización del hospedador desempeña un papel básico en su epidemiología. La mucosa de la parte anterior de la nasofaringe supone el principal lugar de colonización desde la que fácilmente alcanza la piel (Reta *et al.*, 2019). *S. aureus* causa una gran variedad de enfermedades, desde infecciones leves de la piel hasta infecciones

sistémicas severas. Es causa común de infecciones de la piel y subcutáneas, incluyendo foliculitis, furunculosis, celulitis, mastitis e impétigo. Algunas infecciones serias causadas por *S. aureus* son: osteomielitis, neumonía y sepsis (Cuevas *et al.*, 2008).

Se trata de un coco Gram positivo y coagulasa positivo con gran capacidad para formar biofilm, consistente en una matriz de exopolisacáridos que le permite una mejor adhesión a dispositivos médicos o tejidos. *S. aureus* es el principal agente causante de la mayoría de las infecciones estafilocócicas. Además, los mecanismos patógenos de *S. aureus* no solamente dependen de sus factores adhesivos, también de las toxinas, enzimas y de sus defensas contra la inmunidad (de Jong *et al.*, 2019; Tam *et al.*, 2019).

1.1.3 *S. aureus* resistente a meticilina (SARM)

La diseminación de resistencia a los antibióticos en *S. aureus* constituye uno de los principales problemas que afrontan los sistemas sanitarios en la actualidad. La presión selectiva ejercida por el incremento en el uso de la bencilpenicilina dio lugar al aumento de *S. aureus* resistentes a penicilina mediada por la producción de penicilinasas (β -lactamasa) (Barber *et al.*, 1948). La utilización de penicilinas semisintéticas, resistentes a la penicilinasas, fue la solución que permitió frenar las infecciones por esta bacteria. Sin embargo, al poco tiempo de comercializarse estos nuevos antibióticos, como la meticilina, apareció la resistencia bacteriana lo que produjo que este patógeno volviera a convertirse en un problema nosocomial (Lakhundi *et al.*, 2018).

La meticilina se introdujo en la práctica clínica en 1960, aunque ya en 1961 se aisló una cepa SARM (Jevons *et al.*, 1961). La forma más relevante de la resistencia se caracteriza por la producción de una proteína fijadora de penicilina, PBP (del inglés, *Penicillin Binding Protein*) adicional (PBP2') con una baja afinidad de unión por la meticilina. La proteína PBP2' está codificada por el gen *mecA* que forma parte del elemento génico *SCCmec* (del inglés, *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*). La adquisición de diferentes elementos *SCCmec* por parte de *S. aureus* ha dado lugar a los SARM (Liu *et al.*, 2016). La gran diseminación de los SARM alrededor de todo el mundo ha hecho que se empleen en exceso antibióticos para prevenir y tratar las infecciones producidas por este microorganismo. Esto ha producido un incremento en el surgimiento y diseminación de resistencias frente a los mismos, siendo las infecciones causadas por SARM multirresistentes difíciles de tratar (Lakhundi *et al.*, 2018).

1.2. Resistencia a mupirocina en *S. aureus*

La mupirocina (ácido pseudomónico A) es un antibiótico de amplio espectro producido como producto de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* (Wuite *et al.*, 1983). Tiene una estructura química no relacionada con la de otros antibacterianos (Figura 2). Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana debido a la unión reversible a la isoleucil-ARNt sintetasa, la cual está codificada por el gen cromosómico *ileS*, impidiendo la incorporación de la isoleucina a los péptidos nacientes (Thomas *et al.*, 2010; Antonio *et al.*, 1999). Esto se debe a su grupo epóxido, el cual se parece a la isoleucina con lo que puede competir por el sitio activo de la isoleucil-ARNt sintetasa.

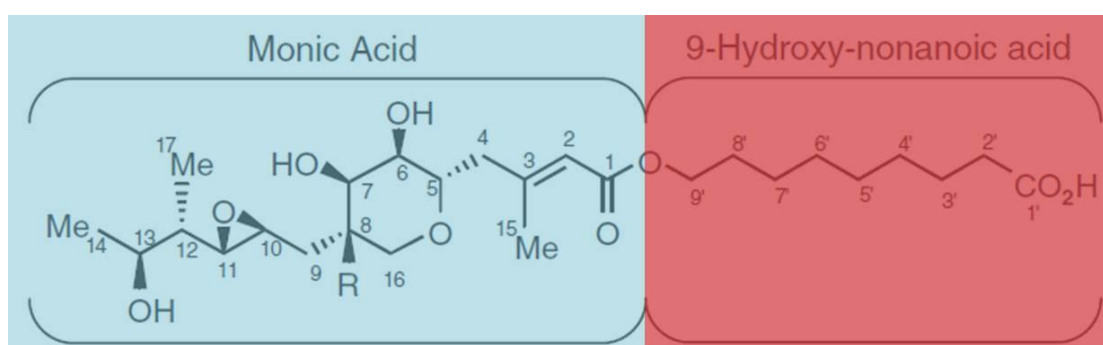


Fig.2. Estructura química de la mupirocina.

La mupirocina se introdujo en la práctica clínica en el año 1985 y se administra exclusivamente como un agente tópico. Los principales usos clínicos de la mupirocina han sido el tratamiento de infecciones menores de piel causadas por los estafilococos y para la descolonización nasal de *S. aureus* (Poovelikunnel *et al.*, 2015). La mupirocina es particularmente importante en la prevención y tratamiento de SARM ya que esta bacteria es una causa principal de infecciones nosocomiales alrededor del mundo.

A lo largo de los años, diferentes estudios han detectado frecuentemente la existencia de cepas de *S. aureus* con sensibilidad reducida a mupirocina. Se han definido dos tipos de resistencia a mupirocina. Primero se describió la resistencia a bajos niveles de mupirocina (Huskisson *et al.*, 1984) y seguidamente resistencia a altos niveles de mupirocina (Rahman *et al.*, 1987). La resistencia a bajos niveles [Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) = 8-256 µg/ml] se considera estable y de baja relevancia clínica (Bradley *et al.*, 1995). Por otro lado, la Hi-Mup^R, con CMI >256 µg/ml se asocia con el fracaso del tratamiento (Cookson *et al.*, 1998).

1.2.1. Bases moleculares de la Hi-Mup^R

En estafilococos, la Hi-Mup^R se ha atribuido a la existencia de una isoleucil-ARNt sintetasa que posee una estructura diferente, no tiene afinidad por la mupirocina y está codificada por el gen adicional *ileS2* o *mupA* (Gilbart *et al.*, 1993; Hodgson *et al.*, 1994). El gen *ileS2* se ubica generalmente en plásmidos conjugativos pertenecientes a la familia de los plásmidos pSK41/pGO1 (Figura 3). Estos plásmidos son capaces de transferirse por sí mismos horizontalmente entre bacterias dando lugar a la diseminación de la Hi-Mup^R (Firth *et al.*, 2018; Partridge *et al.*, 2018; Pérez-Roth *et al.*, 2006).

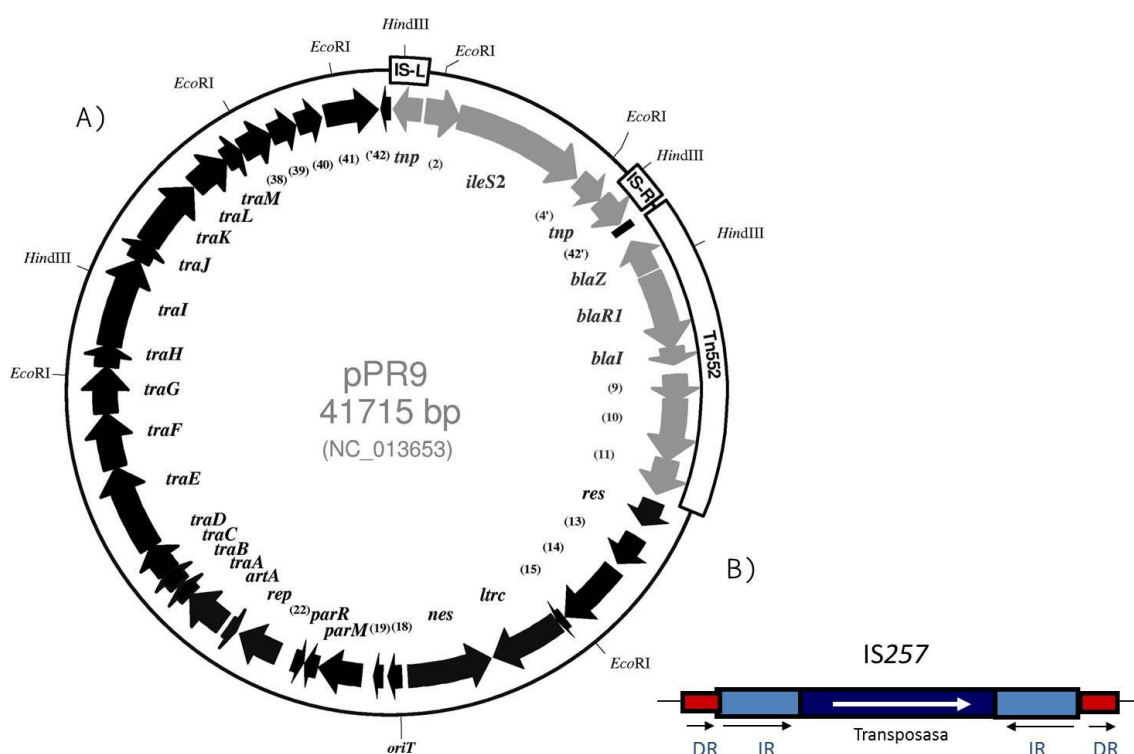


Fig.3. A) Mapa genético del plásmido de la familia pSK41/pGO1, pPR9, portador del gen *ileS2* (Pérez-Roth *et al.*, 2010). IS-L e IS-R: secuencias IS257. B) Estructura de la secuencia de inserción IS257. DR: secuencias directamente repetidas. IR: secuencias inversamente repetidas.

Además, en estos plásmidos el gen *ileS2* suele aparecer flanqueado por copias de la secuencia de inserción 257 (IS257) (Figura 3). Las copias IS257 pueden dar lugar a la movilización del *ileS2* mediante recombinación o transposición (Pérez-Roth *et al.*, 2010). Algunos de estos plásmidos pueden contener determinantes de resistencia adicionales, incluidos aquellos que codifican resistencia a penicilinas, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y clindamicina, dando lugar a que el tratamiento con mupirocina seleccione resistencia a otros antimicrobianos (Thomas *et al.*, 2010).

Adicionalmente, más recientemente se ha descrito en una cepa de *S. aureus* recolectada en Canadá un mecanismo adicional de Hi-Mup^R que se ha atribuido a la presencia de un nuevo gen denominado *mupB* ubicado en un plásmido (Seah *et al.*, 2012) Este gen comparte únicamente un 65.5% y 45.5% de identidad de secuencia con *ileS2* e *ileS* respectivamente. Sin embargo, hasta la fecha solamente se han realizado unos pocos estudios que analizan la presencia del *mupB* (Troulliet-Assant *et al.*, 2015).

Actualmente las cepas Hi-Mup^R no pueden ser erradicadas con la mupirocina y constituyen un problema clínico, especialmente cuando se trata de SARM. Tanto la transferencia horizontal de los plásmidos portadores del *ileS2* como la diseminación clonal de dichas cepas tras la adquisición de la resistencia contribuyen a la dispersión de la Hi-Mup^R (Pérez-Roth *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2010).

1.2.2. Métodos de detección de la resistencia a mupirocina

Existen varios métodos de laboratorio para la evaluación fenotípica de la resistencia a mupirocina en los estafilococos, incluyendo dilución en caldo y agar, difusión empleando discos y el Etest (Findlay *et al.*, 1997; Palepou *et al.*, 1998).

Se han descrito numerosos métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*) para la detección del gen *ileS2*. Una de las ventajas de estos métodos es que no dependen de la expresión del gen para detectar la resistencia. Algunos de estos métodos se basan en una PCR simple para la amplificación del gen *ileS2* (Anthony *et al.*, 1999), mientras que otros llevan a cabo la amplificación simultánea de 1 o varios genes adicionales (McClure *et al.*, 2017). Estos métodos han permitido una mayor rapidez en la identificación de las bacterias y en la detección rápida y fiable del gen *ileS2* responsable de la Hi-Mup^R en *S. aureus*.

En diversos estudios se ha podido observar que los plásmidos portadores del *ileS2* que son estructuralmente diferentes presentan una configuración propia de las regiones IS257-*ileS2* (Woodford *et al.*, 1998; Pérez-Roth *et al.*, 2010). Así, se ha observado que existe una gran heterogeneidad en las regiones IS257-*ileS2*, siendo la configuración de dichas regiones propia de cada uno de los plásmidos. Lo más habitual es que las IS257s que flanquean el gen *ileS2* se encuentren dispuestas directamente repetidas, como en el caso de los plásmidos pUSA03, pV030-8 y pGO400. Sin embargo, a pesar de compartir una misma orientación existe variación en la distancia a

la que se encuentran respecto al gen *ileS2*. En otros plásmidos, como ocurre en el caso del plásmido conjugativo pPR9 las IS257 se ubican en sentidos opuestos (Figura 4).

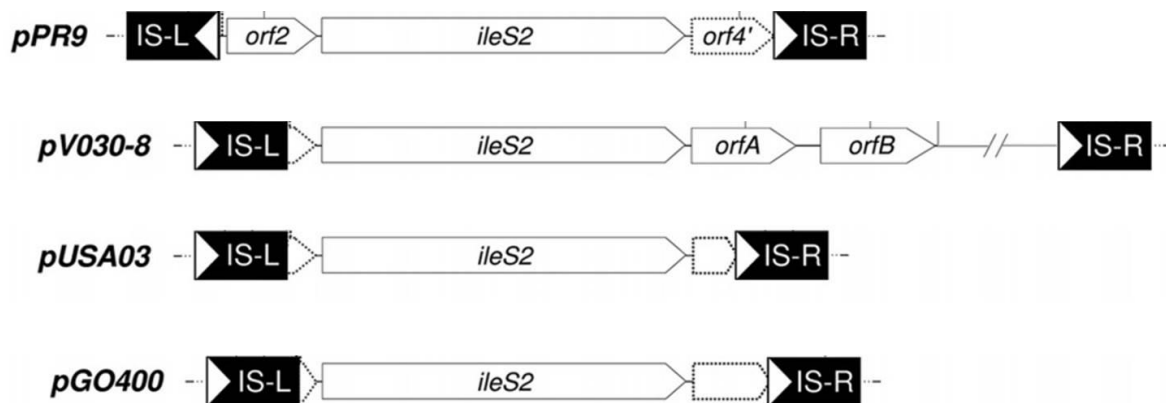


Fig. 4. Organización estructural de las regiones espaciadoras IS257-*ileS2* de los plásmidos portadores del gen *ileS2* pPR9, pV030-8, pUSA03 y pGO400. IS: secuencia de inserción 257, localizadas corriente arriba (IS-L) y corriente abajo (IS-R) del gen *ileS2*.

La amplificación por PCR de dichas regiones altamente heterogéneas ha permitido tipificar y diferenciar los plásmidos sin tener que purificarlos y caracterizarlos mediante la aplicación de métodos convencionales laboriosos y de técnicas engorrosas (González-Domínguez *et al.*, 2016; Pérez-Roth *et al.*, 2011, Woodford *et al.*, 1998).

1.3. Tipificación molecular mediante MLVA

Las técnicas de tipificación molecular tienen como objetivo comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más organismos, con lo que se puede conocer la relación entre aislamientos epidemiológicamente vinculados. Son útiles en la vigilancia y control de brotes porque permiten conocer la clonalidad entre aislados, identificar reservorios y determinar vías de transmisión. Se han desarrollado numerosas técnicas de tipificación molecular: por ejemplo la electroforesis en campo pulsante (PFGE, del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), el análisis de secuencias en múltiples *loci* (MLST, del inglés *Multilocus Sequence Typing*) o aquellas basadas en la PCR (Miao *et al.*, 2017). Una de las técnicas actuales de tipificación molecular que emplea la amplificación mediante PCR es la detección de secuencias repetidas: análisis de secuencias en tándem de número variable en varios *loci* o MLVA (del inglés *Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Assay*) (Sabat *et al.*, 2003).

El MLVA explora mediante amplificación por PCR los polimorfismos de VNTR (del inglés *Variable Number Tandem Repeat*), ya que el número de unidades repetidas de una bacteria a otra suelen variar. Los *loci* que se estudian en ella son *sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp* y *spa*. Son *loci* que presentan VNTR y todos tienen funciones de virulencia. El locus *sdr* incluye 3 genes: *sdrC*, *sdrD* y *sdrE* (Josefsson *et al.*, 1998), que codifican para 3 proteínas Sdr. Éstas, junto con el factor de aglutinación A, codificado por el gen *clfA* y el factor de aglutinación B, codificado por el gen *clfB* son miembros de una familia de proteínas de superficie, que se caracterizan por la presencia de una región R, que contiene varias repeticiones de Ser-Asp codificadas por un fragmento de ADN repetido de 18 nt en el extremo 3'. El locus *ssp* contiene un gen, el *sspA*, que codifica para la serinproteasa V8 cuyo fragmento C-terminal se construye de múltiples repeticiones de tripéptidos (pro-asp-asp) codificados por unidades repetidas de 9 nt. Finalmente, el gen *spa* codifica la proteína A, la cual presenta repeticiones de 18 pb de prolinas.

El análisis mediante MLVA permite discriminar, así como establecer la relación clonal entre los diferentes aislados de *S. aureus* basándose en el número de repeticiones en tándem de estos 7 genes. La amplificación por PCR da lugar a fragmentos que generan un patrón de bandas tras realizar la electroforesis en geles de agarosa. Dicho patrón de amplificación es característico de cada cepa de *S. aureus* (Sabat *et al.*, 2003).

2. Objetivos

Según lo expuesto anteriormente se plantean los siguientes objetivos:

2.1. Objetivo General:

Conocer el/los modo/s de diseminación de la Hi-Mup^R y su asociación con la resistencia a otros antibióticos en una población de *S. aureus* en 2018, prestando especial atención a los elementos genéticos responsables de la resistencia.

2.2. Objetivos Específicos:

1. Comprobar la posible asociación existente entre la Hi-Mup^R y la resistencia a otros antibióticos.
2. Establecer la correlación entre la Hi-Mup^R y la presencia del gen *ileS2*.
3. Definir los genotipos de *S. aureus* mediante análisis MLVA.
4. Determinar la diversidad y diferenciar los elementos genéticos portadores del *ileS2* mediante la tipificación molecular de las regiones espaciadoras IS257-*ileS2*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Periodo de estudio, aislados clínicos de *S. aureus* y otras cepas

Durante el año 2018 se recolectaron e identificaron por parte de la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) un total de 1617 aislados clínicos de *S. aureus*. Los aislados se obtuvieron de muestras de atención primaria y otras consultas externas, así como de muestras hospitalarias y urgencias. Los aislados se obtuvieron a partir de diferentes tipos de muestra (Figura 5).

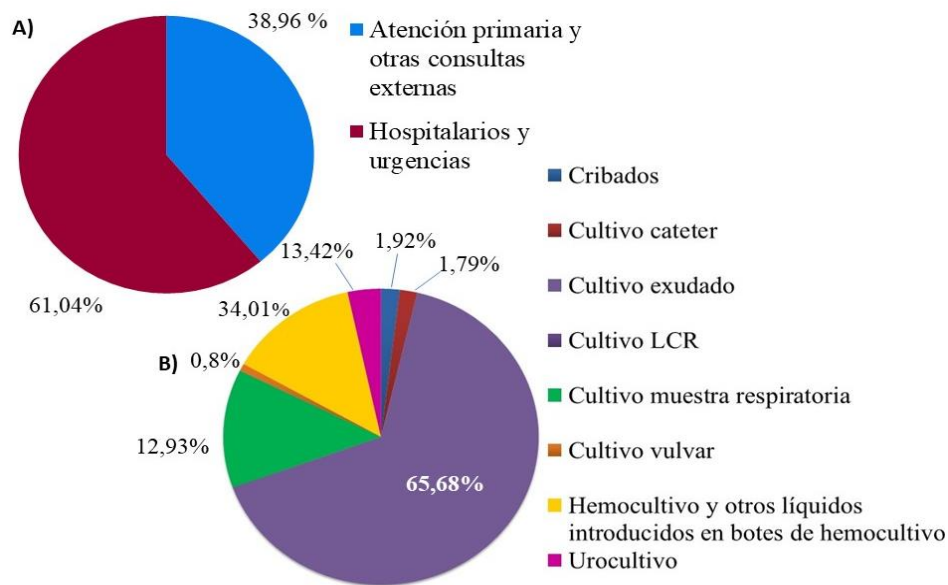


Fig. 5. A) Porcentaje de aislados clínicos de *S. aureus* según el origen. B) Porcentaje de aislados clínicos de *S. aureus* recolectados según el tipo de muestra.

La cepa *S. aureus* NRS107 Hi-Mup^R portadora del gen *ileS2* en el plásmido pGO400 se empleó como control positivo en los ensayos de sensibilidad a mupirocina (Morton *et al.*, 1995). Además, dicha cepa se empleó como control positivo en las reacciones de PCR del gen *ileS2* y de las regiones espaciadoras IS257-*ileS2*. La cepa de *S. aureus* WBG541 sensible a mupirocina se empleó como control negativo.

3.1.1. Identificación y pruebas de sensibilidad antibiótica

La Unidad de Microbiología del HUNSC llevó a cabo la identificación específica y la sensibilidad antibiótica de *S. aureus*. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y métodos automatizados. Las pruebas de sensibilidad antibiótica se llevaron a cabo empleando el sistema automatizado Vitek 2, tarjeta AST-P626 (bioMérieux), determinándose la sensibilidad frente a los siguientes

antibióticos: bencilpenicilina, oxacilina, gentamicina, tobramicina, levofloxacino, eritromicina, clindamicina, linezolid, daptomicina, teicoplanina, vancomicina, tigeciclina, fosfomicina, ácido fuscídico, mupirocina, rifampicina y sulfametoxazol.

Además, en este trabajo se realizaron pruebas con algunos de los aislados de *S. aureus* para confirmar sus características fenotípicas. La tinción diferencial de gram se realizó siguiendo el protocolo clásico establecido con el objetivo de observar la morfología y agrupación de las bacterias, así como confirmar el carácter gram + de las mismas. Además, para intentar poner de manifiesto la presencia de cápsula de polisacáridos se realizó la tinción negativa con nigrosina siguiendo el protocolo clásico.

Algunos aislados Hi-Mup^R fueron analizados en este trabajo para confirmar el fenotipo de resistencia a mupirocina siguiendo los métodos previamente descritos (Findlay *et al.*, 1997; Palepou *et al.*, 1998). Se empleó el medio Mueller Hinton (bioMérieux) aplicando el método de Kirby-Bauer y usando discos de mupirocina de 5 y 200 µg (Oxoid). La lectura del disco de 5 µg se realizó aplicando el criterio previamente establecido que define la sensibilidad a mupirocina cuando el halo es ≤13 mm. En el caso del disco de 200 µg se consideró como sensible cualquier halo de inhibición. Los aislados resistentes con el disco de 5 µg y con algún halo de inhibición con el disco de 200 µg se clasifican de forma presuntiva como resistentes a bajos niveles de mupirocina. Los que no mostraron halo de inhibición con el disco de 200 µg se consideraron Hi-Mup^R. Para determinar las CMI_s a mupirocina se usaron tiras de Etest (AB Biodisk) aplicando las normas del fabricante. Las tiras Etest se fabrican creando un gradiente de concentraciones de mupirocina en el rango de 0,064 hasta 1.024 µg/ml. En todos los ensayos, se empleó el DensiCHECKTMplus (Biomérieux) para ajustar el inóculo bacteriano en la escala de McFarland a 0.5 ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml). Tras colocar los discos y los Etest en las placas de Petri sembradas con las bacterias, éstas se incubaron a 37°C, 18 h. Tras la incubación se leyeron e interpretaron los resultados.

3.2. Siembra y cultivo de microorganismos

3.2.1. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación.

Los medios de cultivo empleados fueron BHI (del inglés *Brain Heart Infusion*), Luria-Bertani (LB), Mueller-Hinton (MH) y Mannitol-Salt Agar (MSA) los cuales se usaron en forma de preparado comercial. La composición se muestra en las Tablas 1-3:

Tabla 1. Composición del medio LB	
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua hasta	1000 ml
pH 7	

Tabla 3. Composición del medio MH	
Infusión de carne	300 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	15 g
Agua hasta	1000 ml
pH 7,3	

Tabla 2. Composición del medio MSA	
Extracto de carne bovina	1 g
Digerido pancreático de caseína	5 g
Digerido péptico de tejido animal	5 g
Cloruro sódico	75 g
D-manitol	10 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	15 g
Agua hasta	1000 ml
pH 7,4	

Los aislados de *S. aureus* se sembraron rutinariamente en medio sólido usando placas con medio BHIA y, posteriormente, se incubaron a 37° C durante 24 horas.

La conservación de los aislados se llevó a cabo en tubos eppendorf de 1.5 ml empleando una solución de leche en polvo en agua mili-Q al 10% (p/v) previamente autoclavada. En cada tubo se añade 1 ml de la solución de leche y se introducen 5 o 6 colonias crecidas en placas de BHIA. Los tubos se guardan en el congelador a -80°C y se sembraron nuevamente cuando fue necesario para realizar los estudios posteriores.

3.3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

3.3.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR y secuenciación.

En las reacciones de amplificación por PCR se empleó el termociclador de ADN i-Cycler (Bio-Rad), ADN taq polimerasa (Bioline), tampón de reacción 1X [16mM (NH₄)₂SO₄, 67 MM Tris-HCl (pH 8,8)], MgCl₂ (Bioline) y desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Promega) según las instrucciones de los fabricantes. El programa de temperaturas para la amplificación, así como la concentración de los reactivos empleados para cada una de las dianas génicas se detallan en los apartados correspondientes.

La secuenciación nucleotídica directa de los productos de PCR se realizó previa purificación de los mismos mediante el uso del kit Exosap-it (Qiagen). La secuenciación se llevó a cabo mediante el método de terminación de la cadena empleando

dideoxirribonucleótidos en un termociclador MJ Research PTC-200 (Bio-Rad). La purificación de los productos de la secuenciación se llevó a cabo mediante el kit *Big Dye Terminator 3.1* (Applied Biosystems™). Se utilizó el secuenciador automático 3500 Series Genetic Analyzers (Applied Biosystems™) para la separación de los productos de las reacciones de secuenciación y la recolección de las secuencias. Estas fueron visualizadas y editadas mediante el programa informático Chromas 2.6.6.

Los cebadores empleados en este trabajo para la amplificación por PCR y la secuenciación de fragmentos de ADN se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores empleados				
Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Tamaño fragmento	Referencia
<i>ileS2</i>	MupA1	TATATTATGCGATGGAAGGTTGG	456 pb	Anthony <i>et al.</i> , 1999.
	MupA2	AATAAAATCAGCTGGAAAGTGTTG		
Región IS257- <i>ileS2</i>	<i>ileS2</i> -5'	CCATGTCAACCCAGTATCC	Variable	Pérez-Roth <i>et al.</i> , 2011.
"	<i>ileS2</i> -3'	TCGGTGTAACCTGGGGAATTA		"
"	IS257 _F	GGCATGGCGAAAATCCGTAG		"
"	IS257 _R	TGGCGTATTGATGAGACGTACATC		"
<i>clfA</i>	ClfA-F	GATTCTGACCCAGGTTTCAGA	"	Sabat <i>et al.</i> , 2003.
	ClfA-R	CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT		"
<i>clfB</i>	ClfB-F	ATGGTGATTCAGCAGTAAATCC	"	"
	ClfB-R	CATTATTTGGTGGTGTAACTCTT		"
<i>sdr</i>	SdrCDE-F	GTAACAATTACGGATCATGATG	"	"
	SdrCDE-R	TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT		"
<i>spa</i>	Spa-F	AGCACCAAAAGAGGAAGACAA	"	"
	Spa-R	GTTTAACGACATGTACTCCGT		"
<i>ssp</i>	SspA-F	ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA	"	"
	SspA-R	TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC		"

En todas las reacciones de amplificación por PCR el ADN molde se obtuvo suspendiendo 1 colonia bacteriana en 25 µl de agua estéril y añadiendo 1.5 µl de dicha suspensión directamente en los tubos de PCR (Pérez-Roth *et al.*, 2001).

3.3.1.1. PCR para la detección del gen *ileS2*

La detección del gen *ileS2* se realizó siguiendo un protocolo previo diseñado para la amplificación de un fragmento interno de 456 pb, excepto que en este trabajo se

usó el ADN molde obtenido según se describió en el apartado 3.3.1. La concentración de los reactivos y las condiciones de PCR fueron las descritas (Anthony *et al.*, 1999).

3.3.1.2. Amplificación simultánea de las regiones espaciadoras IS257-*ileS2*

Se llevó a cabo mediante la aplicación de un método previamente descrito (Pérez-Roth *et al.*, 2011). Brevemente, se realizaron 4 PCRs simples para cada aislado clínico de *S. aureus* con el objetivo de detectar la presencia de copias IS257 corriente arriba (IS257-L) y corriente abajo (IS257-R) del gen *ileS2*. Las regiones entre el gen *ileS2* y la copia IS257-L más próxima a este fueron amplificadas con los cebadores *ileS2*-5' e IS257_F (PCR1). Para investigar la presencia de la copia IS257-L en la dirección opuesta, el cebador *ileS2*-5' se empleó conjuntamente con el IS257_R (PCR2). Las regiones entre el gen *ileS2* y la copia IS257-R más próxima fueron amplificadas con los cebadores *ileS2*-3' e IS257_F (PCR3) o IS257_R (PCR4) (Figura 6). La visualización de los productos de amplificación y la estimación de los tamaños se llevó a cabo según se describe en el apartado 3.3.2. Los parámetros de amplificación por PCR fueron: 94°C 5 min; 30 ciclos de 94°C, 30 seg; 60°C, 40 seg y 72°C, 1 min; y una fase de extensión final a 72°C durante 10 min. Los cebadores empleados se indican en la Tabla 4.

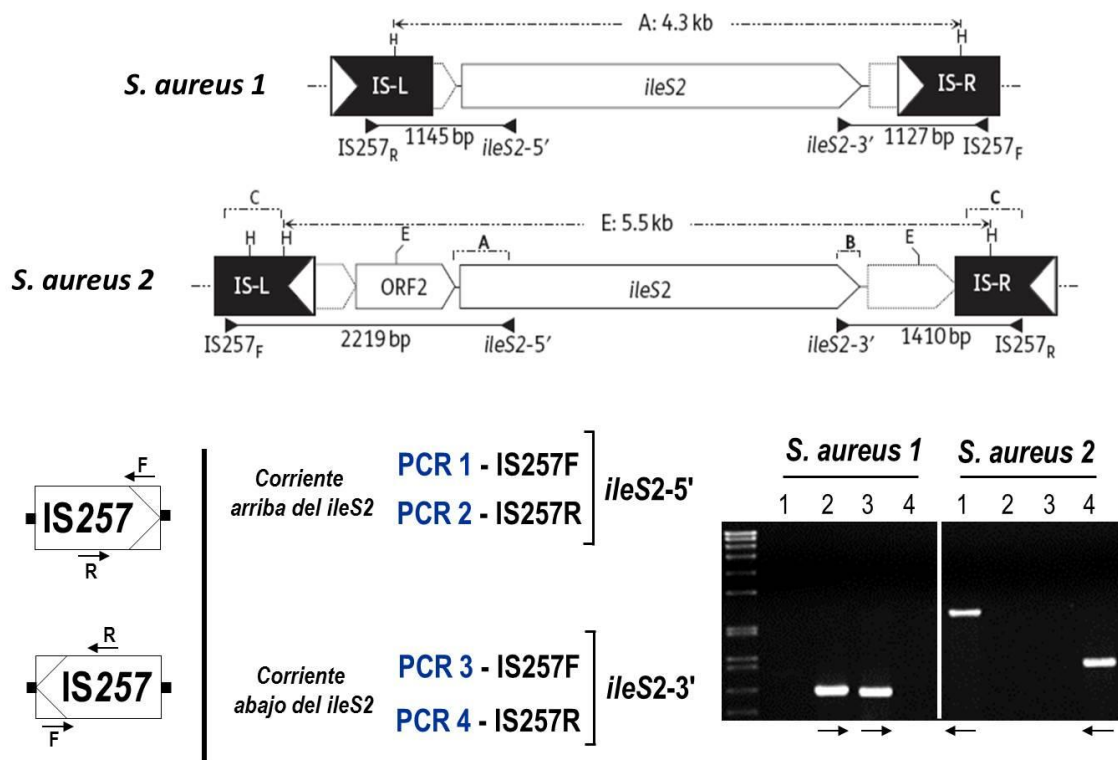


Fig. 6. Esquema del procedimiento de amplificación simultánea mediante PCR de las regiones espaciadoras IS257-*ileS2*. Se muestra el ejemplo de dos aislados de *S. aureus* (*S. aureus* 1 y *S. aureus* 2) con diferentes configuraciones IS257-*ileS2* corriente arriba y abajo del gen *ileS2*.

3.3.1.3. Análisis y comparación de secuencias.

Las secuencias de ADN se analizaron empleando el programa de alineamientos múltiples Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2018). La búsqueda de homologías de las secuencias de nucleótidos se realizó a través del programa BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI. La consulta de secuencias depositadas en las bases de datos GenBank se realizó usando Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3.2. Electroforesis convencional en geles de agarosa

La electroforesis convencional en geles de agarosa sumergidos en tampón de electroforesis se empleó para comprobar el éxito de las reacciones de PCR y estimar los tamaños de los fragmentos de amplificación. Se utilizaron sistemas de electroforesis horizontal y el tampón empleado fue el TAE 1X (40mM Tris; 40mM acetato; 2 mM EDTA; pH 8,0). La agarosa empleada fue Agarose BioReagent low EEO (Sigma) y la concentración varió entre un 0,6 y un 2% (p/v) dependiendo del tipo y tamaño de las moléculas que se pretendían separar. Se emplearon los siguientes marcadores de peso molecular (Roche): el marcador II, consistente en 8 fragmentos producto de la digestión del ADN del fago lambda con la endonucleasa de restricción *Hind*III y el marcador XIV, un marcador de fragmentos de 100 pb empleado para la estimación de los tamaños de los productos de amplificación mediante PCR. Se añadió SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) para poder visualizar los fragmentos de ADN. Las muestras de ADN se mezclaron con un tampón de carga 10X (Takara). Los geles se visualizaron con un transiluminador de radiación ultravioleta y se fotografiaron empleando el analizador de imagen Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad) quedando registradas las imágenes digitales.

3.3.3. Extracción del ADN plasmídico total

El ADN plasmídico total de *S. aureus* se obtuvo mediante el empleo del kit QIAPREP Spin Plasmid (Qiagen). El material de partida fueron cultivos bacterianos preparados en 10 ml de medio LB que fueron incubados a 37°C durante aproximadamente 6 horas con agitación vigorosa (150-200 r.p.m). El procedimiento fue modificado mediante la adición de lisostafina (Sigma) a una concentración de 50 µg/ml en el tampón de suspensión, seguido de una incubación durante 1 hora a 37°C.

3.3.4. Tipificación molecular mediante MLVA

El MLVA se llevó a cabo siguiendo una modificación del método previamente descrito (Sabat *et al.*, 2003). La reacción de PCR se llevó a cabo empleando las siguientes concentraciones: tampón de reacción 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPS 0.2 mM, 1.2 µM de los cebadores ClfA-F, ClfA-R, ClfB-F, ClfB-R, SdrCDE-F, SdrCDE-R, 0.5 µM de Spa-F y Spa-R, 1 µM de los cebadores Sspa-F y Sspa-R, y 0.005 U de Taq ADN polimerasa (Bioline) en un volumen final de 20 µl. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 1 y los parámetros fueron: 94°C, 5 min seguido de 20 ciclos (94°C, 30 seg, 58°C, 45 seg; 72°C, 30 seg) con una extensión final a 72°C 5 min. Los fragmentos de PCR se resolvieron en geles al 2% de agarosa y se usó el marcador XIV.

Se consideraron patrones (genotipos) diferentes aquellos que mostraron al menos un fragmento de amplificación de diferencia (Sabat *et al.*, 2003). Aplicando este criterio diversos estudios han observado una buena correlación con los genotipos obtenidos con otros métodos (Rivero-Pérez *et al.*, 2010). Los patrones se analizaron visualmente y únicamente se definió el número de genotipos diferentes y no la relación entre los mismos. Cada genotipo diferente se nombró con una letra minúscula del abecedario, desde el tipo que incluyó un mayor número de aislados al de menor número de aislados.

3.4. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron usando la versión 15.0 del paquete estadístico SPSS (Chicago, IL, USA). El test exacto de Fisher se empleó para variables binomiales y se consideró estadísticamente significativo un valor de p de 2 colas <0.05 .

4. Resultados y Discusión

4.1. Aislados clínicos de *S. aureus* y sensibilidad antibiótica

La aparición de la resistencia a meticilina en *S. aureus* y la dispersión general de cepas de SARM por todo el mundo supone uno de los retos terapéuticos y de control de la infección más importante en la práctica clínica. Además, las cepas de *S. aureus* son cada vez más resistentes a los antibióticos (Foster *et al.*, 2017). Del total de 1617 aislados de *S. aureus* recolectados en el HUNSC en el año 2018, un total de 401 (24,8%) mostraron resistencia a meticilina y fueron clasificados como SARM; los restantes 1216 aislados (75,2%) fueron sensibles a meticilina y se clasificaron como SASM. El % de SARM es similar al obtenido en estudios realizados en España. Diversos estudios multicéntricos de prevalencia han mostrado aumentos en el % de SARM hasta alcanzar cifras superiores al 30%. En cualquier caso la situación en los diferentes hospitales es heterogénea. (Cuevas *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2007).

Los aislados fueron analizados para comprobar la sensibilidad frente a un conjunto de antimicrobianos. En la Figura 7 se muestran los resultados de sensibilidad para cada antibiótico ensayado. El % de Hi-Mup^R (6,7%) es similar al descrito en Europa (Dadashi *et al.*, 2019). Ningún aislado mostró resistencia a linezolid y a tigeciclina.

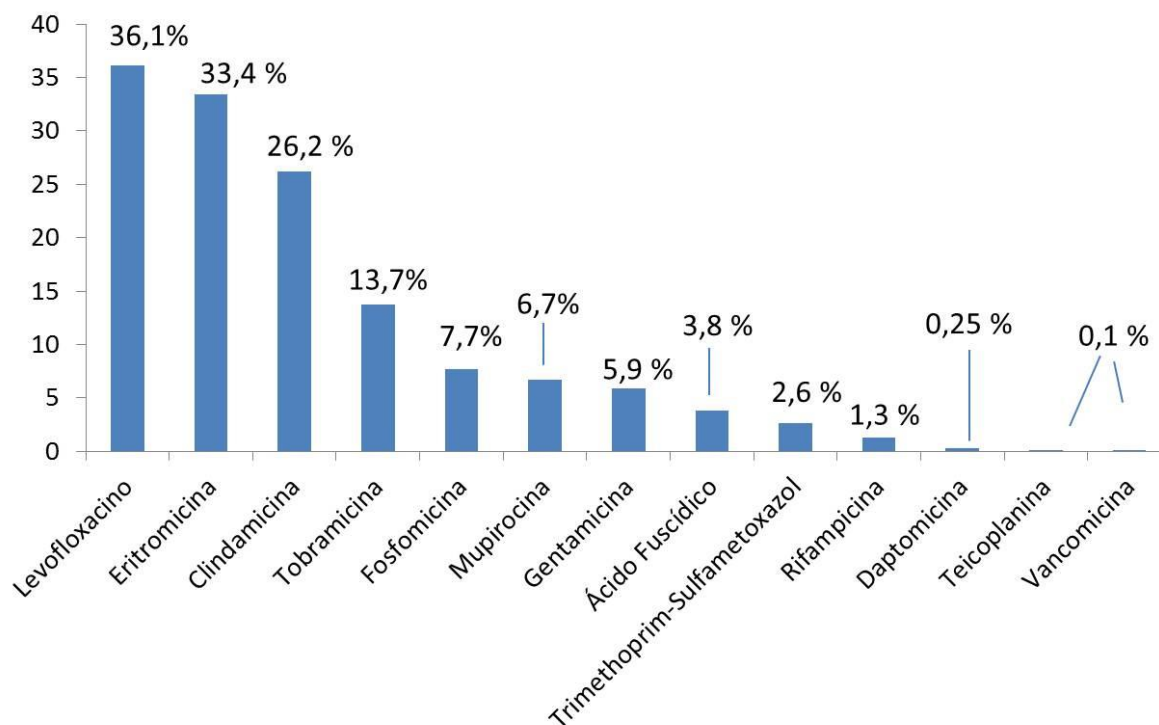


Fig. 7. Porcentajes de resistencia a los antibióticos ensayados (tarjeta AST-P626)

4.1.1. Asociación entre la Hi-Mup^R y la resistencia a otros antibióticos

En varios estudios previos se ha encontrado una asociación entre la Hi-Mup^R y la resistencia a otros antibióticos. En ocasiones se ha podido comprobar que esto es debido a que los plásmidos portadores del gen *ileS2* pueden contener determinantes de resistencia adicionales, incluyendo aquellos que codifican resistencia a los antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina y clindamicina (Carter *et al.*, 2018). Incluso se ha descrito asociación entre la Hi-Mup^R y la multiresistencia (Cadilla *et al.*, 2011). Esto hace que surja la posibilidad que el uso de la mupirocina seleccione co-resistencia a otros antimicrobianos (Thomas *et al.*, 2010).

En este trabajo nos planteamos comprobar si existía asociación entre la Hi-Mup^R y la resistencia a otros antibióticos en la población de *S. aureus*. Para ello comparamos los porcentajes de resistencia a los diferentes antibióticos entre los 1508 *S. aureus* sensibles a mupirocina y los 109 *S. aureus* Hi-Mup^R. Los aislados Hi-Mup^R fueron más propensos a ser resistentes a los siguientes antibióticos que los aislados sensibles a mupirocina: tobramicina (59.6% frente a 10.5%; $p < 0.001$), gentamicina (55.3% frente a 2.4%; $p < 0.001$), eritromicina (59.2% frente a 31.6%; $p < 0.001$), levofloxacino (55.3% frente a 25.4%; $p < 0.001$) y ácido fuscídico (16.3% frente a 3%; $p < 0.001$). No se detectaron diferencias entre ambos grupos de *S. aureus* para el resto de los antibióticos.

En el caso de la asociación entre la resistencia a altos niveles de mupirocina y la resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina, ésta se ha atribuido a la co-localización de los genes *aacA-aphD* e *ileS2* en los mismos plásmidos (McDougal *et al.*, 2010; Pérez-Roth *et al.*, 2006, 2013). Debido a que en este trabajo no hemos llevado a cabo la caracterización detallada de los elementos genéticos portadores del gen *ileS2* no es posible comprobar esta posibilidad. De cualquier manera, el hallazgo de la asociación entre la resistencia a mupirocina y otras resistencias antibióticas está en consonancia con algunos estudios previos y tiene importantes implicaciones clínicas desde el punto de vista del tratamiento antibiótico. El tratamiento con mupirocina puede dar lugar a la co-selección de aislados de *S. aureus* resistentes a otros antibióticos.

4.2. Aislados de *S. aureus* Hi-Mup^R seleccionados para su estudio.

Para profundizar en el estudio de la resistencia a altos niveles de mupirocina, en este trabajo se seleccionaron aleatoriamente un total de 42 de los 109 aislados Hi-Mup^R. De estos aislados *S. aureus*, un total de 18 (42,9%) eran SASM y 24 (57,1%) SARM.

En la Figura 8 se muestra un ejemplo del aspecto de las colonias de *S. aureus*. Se observaron diferencias entre los aislados, tanto en el tamaño de las colonias como en la pigmentación. Algunos aislados, dieron lugar a colonias grandes y amarillentas, mientras que otros produjeron colonias más pequeñas y blanquecinas. Ambos tipos tenían un aspecto cremoso, bordes lisos y eran convexas, típicas colonias de *S. aureus*.

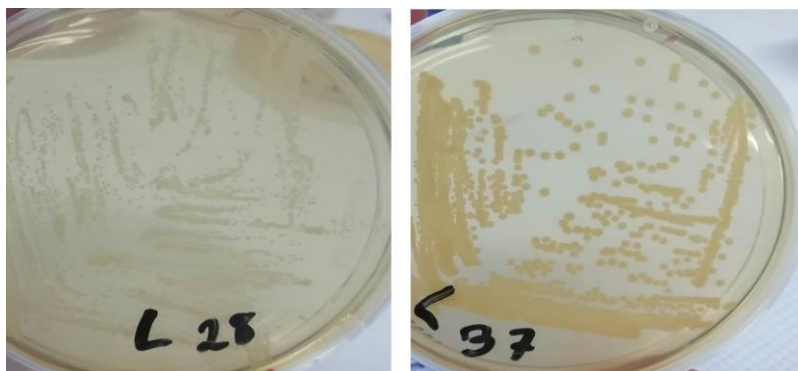


Fig. 8. Crecimiento de las colonias de los aislados clínicos SASM L28 y SARM L37 tras ser sembrados en medio BHIA e incubados a 37°C, 18-24 h.

Con el objetivo de corroborar algunas de las características fenotípicas propias de *S. aureus*, se seleccionaron los aislados L10, L30, L33 y L42. Como se puede apreciar en la Figura 9, los aislados sometidos a la tinción se presentan como cocos grampositivos, que aparecen en parejas (diplococos) y en ocasiones se aprecia el típico agrupamiento en racimos. Además, para intentar poner de manifiesto la posible presencia de cápsula bacteriana se realizó una tinción negativa con nigrosina. La comparación entre la imagen de la tinción de Gram con la imagen de la tinción negativa sugiere que los aislados analizados no presentan cápsula ya que no se observa una diferencia en el tamaño de las bacterias (Figura 9). La cápsula, es un importante factor de virulencia que se encuentra en algunas cepas de *S. aureus* (Brinoli *et al.*, 2019).

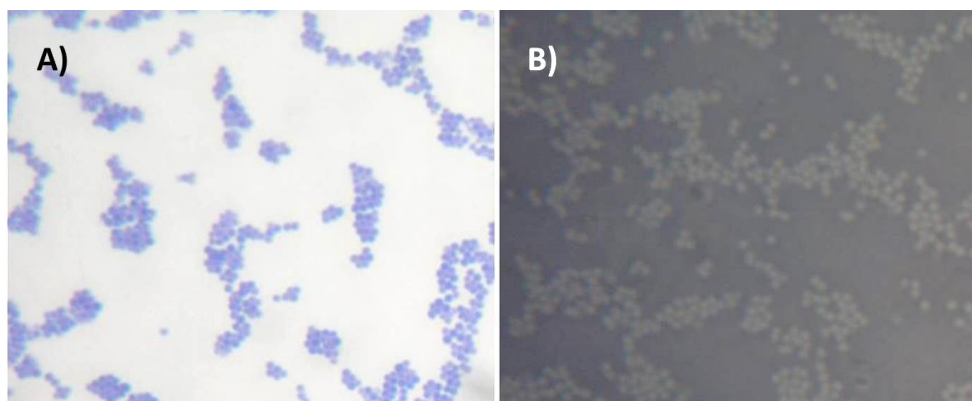


Fig. 9. Tinción de Gram (A) y tinción negativa (B) del aislado SARM L42.

Para confirmar la identificación específica, los aislados se sembraron en placas con medio MSA. El crecimiento de los 5 aislados de *S. aureus* fue similar al observado en la Figura 10. Se observan colonias amarillas como consecuencia de la fermentación del manitol, una característica diferencial de *S. aureus* en el género *Staphylococcus*.

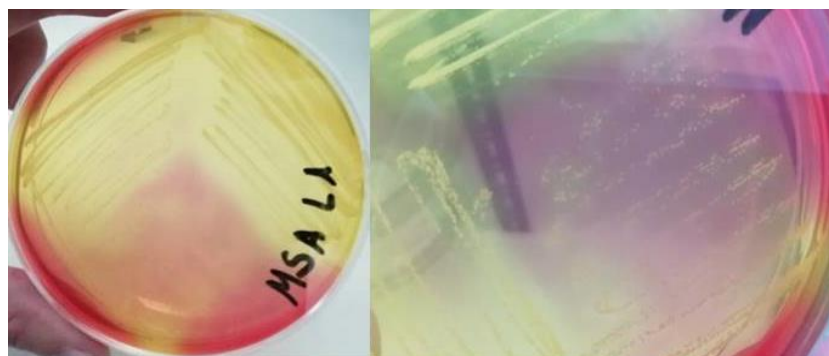


Fig. 10. Crecimiento de *S. aureus* en medio MSA a 37°C durante 18 h de incubación

Aunque previamente los 42 aislados fueron clasificados como Hi-Mup^R mediante el empleo del Vitek2, se seleccionaron los aislados L27 y L42 para confirmar el fenotipo de resistencia mediante el empleo de la técnica de difusión en discos y tiras de Etest tal como se describió en el apartado 3.1.1. Se incluyó la cepa NRS107 como control + y un aislado sensible a mupirocina, la cepa WBG541. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos tras la medición de los halos de inhibición formados alrededor de los discos de ambas concentraciones, así como de la tira del Etest.

Tabla 5. Resultados de difusión en disco y Etest de los aislados L27 y L42			
Muestra	Difusión en disco (5 µg)	Difusión en disco (200 µg)	Etest
SASM L27	Resistente (sin halo)	Resistente (sin halo)	Resistente (sin halo)
SARM L42	Resistente (halo de 1-2mm)	Resistente (sin halo)	Resistente (sin halo)
NRS 107	Resistente (sin halo)	Resistente (sin halo)	Resistente (sin halo)
WBG 541	Sensible (halo de 19 mm)	Sensible (halo de 23 mm)	Sensible

Los resultados empleando los discos de 5 y 200 µg permitieron confirmar que los aislados L27 y L42 tienen un fenotipo Hi-Mup^R ya que incluso alrededor del disco de 200 µg no se observa halo de inhibición del crecimiento (Figura 11, Tabla 5). Los resultados de los ensayos con el Etest permitieron confirmar que ambos aislados presentan una CMI ≥ 1024 µg/ml (Figura 11). Estos resultados confirman los obtenidos mediante el uso de la tarjeta AST-P626 empleando el sistema automatizado Vitek 2.

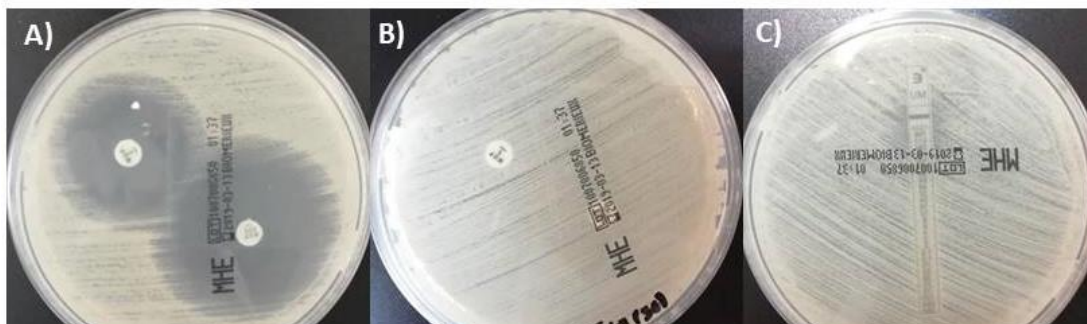


Fig. 11. Antibiograma empleando discos de mupirocina de 5 y 200 µg: A) *S. aureus* WBG541 y B) *S. aureus* NRS107. C) Etest del aislado clínico SARM L42

4.3. Correlación entre el fenotipo Hi-Mup^R y la presencia del gen *ileS2*.

En la gran mayoría de estudios realizados hasta la fecha (Gilbart *et al.*, 1993; Hodgson *et al.*, 1994; Williamson *et al.*, 2017), el fenotipo Hi-Mup^R en estafilococos se debe a la expresión del gen *ileS2*. Aunque la presencia del gen *ileS2* está casi siempre asociado con la Hi-Mup^R dos estudios previos detectaron aislados portadores del *ileS2* con resistencia a bajos niveles de mupirocina (Lee *et al.*, 2011; Udo *et al.*, 2003). En uno de dichos estudios se observó que el *ileS2* se encontraba integrado en el cromosoma y no en un plásmido (Udo *et al.*, 2003). De cualquier manera, se han detectado de manera esporádica *S. aureus* fenotípicamente sensibles a mupirocina portadores del *ileS2* en plásmidos. En algunos de dichos aislados se ha descrito una mutación que afecta a la pauta de lectura en el *ileS2* (Driscoll *et al.*, 2007), aunque en otros aislados, a pesar de ser fenotípicamente sensibles a mupirocina no se han detectado mutaciones en el *ileS2*, dando lugar a la posibilidad de la existencia de mutaciones en regiones reguladoras o promotoras (Fritz *et al.*, 2013). Además, el gen *mupB* podría conferir Hi-Mup^R, aunque no ha sido habitual la detección de dicho gen (Williamson *et al.*, 2017).

Para estudiar el mecanismo de Hi-Mup^R en la población estudiada se llevó a cabo la amplificación del gen *ileS2* en la muestra seleccionada de 42 aislados resistentes. Se incluyó la cepa *S. aureus* NRS107 como control positivo de amplificación del *ileS2* y 7 aislados clínicos sensibles (CMI <2 µg/ml) o con bajos niveles de resistencia a mupirocina (CMI 8-256 µg/ml). Tanto el control + como en cada uno de los 42 aislados Hi-Mup^R se obtuvo la amplificación de un fragmento cuyo tamaño estimado mediante comparación con el marcador de peso molecular, se corresponde con el esperado, aproximadamente 450 pb (Figura 12). No se obtuvo producto de amplificación en ninguno de los aislados clínicos sensibles a mupirocina ni

en los que mostraron bajos niveles de resistencia. Por lo tanto, se obtuvo una concordancia del 100% entre el fenotipo Hi-Mup^R y la presencia del *ileS2* (Tabla 6).

Para confirmar que el fragmento de PCR se correspondía con la región esperada del gen *ileS2* seleccionamos el producto de amplificación de uno de los aislados clínicos Hi-Mup^R con el fin de obtener su secuencia de nucleótidos y así poder compararla con las secuencias nucleotídicas depositadas en las bases de datos. La secuencia de nucleótidos obtenida para el gen *ileS2* (región de 420 pb) mostró un porcentaje de identidad del 100% con respecto a las secuencias del gen *ileS2* del plásmido pPR9, entre otras secuencias. Esto indica que el fragmento de amplificación se corresponde con el esperado y que el *ileS2* se encuentra conservado, al menos en el *S. aureus* analizado.

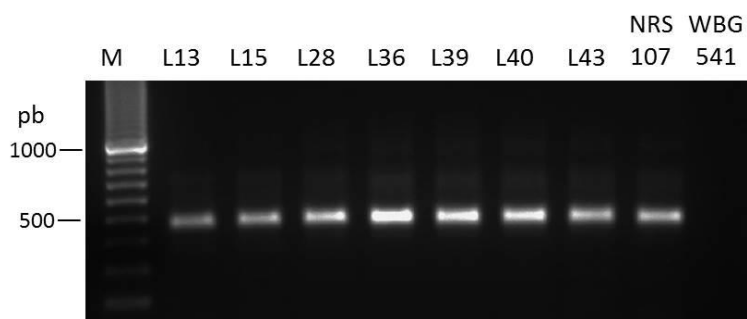


Fig. 12. Amplificación mediante PCR del fragmento del gen *ileS2*.

La correlación encontrada en este trabajo entre la expresión del fenotipo Hi-Mup^R y la presencia del gen *ileS2* está en concordancia con lo que se ha descrito en la mayoría de los estudios previos (Williamson *et al.*, 2017). Aunque no se comprobó la relación directa entre la presencia del *ileS2* y el fenotipo de resistencia (por ejemplo, mediante experimentos de curado, conjugación y/o knock-out), los resultados sugieren que la presencia del gen *ileS2* es la responsable del fenotipo de resistencia observado. Sin embargo, ya que no se ensayó la amplificación del gen *mupB* no podemos descartar la coexistencia de ambos genes en los aislados, algo que no ha sido descrito.

4.4. Patrones de amplificación de las regiones espaciadoras IS257-*ileS2*.

La detección y caracterización de los plásmidos portadores del *ileS2* en los aislados resistentes es útil ya que permite identificar el plásmido responsable de la resistencia en cada aislado y conocer mejor la dispersión de la resistencia. Sin embargo, los métodos de extracción plasmídica en *S. aureus* son complicados. Además, la mayor parte de los aislados Hi-Mup^R son portadores de múltiples plásmidos y es difícil asociar el gen *ileS2* a un plásmido concreto (González-Domínguez *et al.*, 2016; Pérez-Roth *et al.*, 2006).

Tabla 6. Características de las 42 cepas Hi-Mup ^R seleccionadas				
Cepa	CMI mupirocina (Vitek 2)	PCR <i>ileS2</i>	Patrón IS257- <i>ileS2</i>	Patrón MLVA
(SARM) L1	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L2	>=512	+	I	a
(SARM) L4	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L5	>=512	+	I	a
(SARM) L6	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L7	>=512	+	I	e
(SARM) L9	>=512	+	I	a
(SASM) L10	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L11	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L12	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L13	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L14	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L15	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L16	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L17	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L18	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L19	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L20	>=512	+	II	f
(SARM) L21	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L22	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L23	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L24	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L26	>=512	+	III	g
(SASM) L27	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L28	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L30	>=512	+	IV	a
(SASM) L31	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L32	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L33	>=512	+	IV	c
(SASM) L36	>=512	+	II	b
(SARM) L37	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L38	>=512	+	IV	c
(SARM) L39	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L40	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L41	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L42	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L43	>=512	+	II	d
(SASM) L44	>=512	+	No testada	No testada
(SARM) L45	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L46	>=512	+	No testada	No testada
(SASM) L47	>=512	+	II	b
(SASM) L48	>=512	+	No testada	No testada

La amplificación simultánea de las regiones IS257-*ileS2* permite obtener información sobre los elementos portadores del gen *ileS2* sin necesidad de llevar a cabo extracciones engorrosas, así como laboriosos experimentos de conjugación y curado. (Pérez-Roth *et al.*, 2011, 2013; González-Domínguez *et al.*, 2016). Para obtener

información sobre dichos elementos seleccionamos 12 de los 42 aislados Hi-Mup^R (4 SASM y 8 SARM) (Tabla 6). La extracción del ADN plasmídico total de algunos de dichos aislados demostró la existencia de múltiples plásmidos en cada uno de ellos (resultados no mostrados). Esto dificulta la diferenciación de los plásmidos portadores del *ileS2*. Por tanto, como aproximación para diferenciar los elementos portadores del *ileS2* en cada aislado se llevó a cabo la amplificación de las regiones IS257-*ileS2*.

Los resultados obtenidos sugieren la presencia IS257s flanqueando al gen *ileS2* en los 12 aislados de *S. aureus*. Según lo esperado, dependiendo de la orientación de las copias IS257, se obtuvieron fragmentos de PCR en 2 de las 4 PCRs realizadas para cada aislado, uno para cada región corriente arriba y abajo del gen *ileS2*. Según dicha orientación y los tamaños estimados de los fragmentos de amplificación, se identificaron 4 patrones de amplificación IS257-*ileS2* diferentes para los 12 aislados ensayados (Tabla 6). Los patrones I y II indican la presencia de IS257s directamente repetidas flanqueando al *ileS2*, mientras que los patrones III y IV indican la presencia de IS257s en direcciones opuestas. Los patrones I, II, III y IV se detectaron en 4, 4, 1 y 3 aislados, respectivamente (Tabla 6). Los patrones I, II y IV fueron detectados tanto en aislados SASM como SARM. Esto sugiere la posibilidad de que dichos elementos portadores del *ileS2* estén implicados en la transferencia horizontal de la Hi-Mup^R entre SASM y SARM, algo que ya se ha descrito (Chaves *et al.*, 2004). En la Figura 13 se muestran a modo de ejemplo los patrones de amplificación más prevalentes, el I y II.

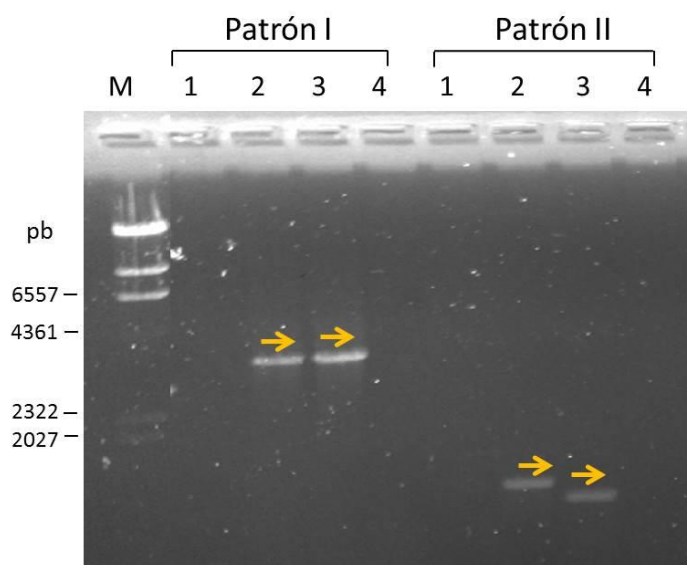


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos de amplificación de las regiones IS257-*ileS2* obtenidos para las configuraciones I y II. Línea 1, PCR1; línea 2, PCR2; línea 3: PCR 3 y línea 4, PCR 4. M: marcador de peso molecular II (Roche).

Diversos estudios (Pérez- Roth *et al.*, 2011; 2013) han mostrado que el gen *ileS2* suele aparecer ubicado en plásmidos y que plásmidos estructuralmente diferentes muestran configuraciones IS257-*ileS2* distintas. Como consecuencia de esto dan lugar a patrones de amplificación de las regiones IS257-*ileS2* únicos. Aunque el método detecta las regiones IS257-*ileS2*, y no propiamente los plásmidos, dado que el gen *ileS2* se ha detectado generalmente en plásmidos, es razonable asumir que los productos de amplificación provienen de plásmidos. Según estos hallazgos previos, los resultados obtenidos sugieren la existencia de 4 elementos portadores del *ileS2* en los 12 *S. aureus*.

4.5. Tipos clonales (genotipos MLVA) de *S. aureus*

Para conocer los diferentes clones de *S. aureus* portadores de la Hi-Mup^R, los 12 aislados seleccionados fueron tipificados mediante MLVA. Se consiguieron tipificar con éxito todos los aislados, por lo que capacidad de tipificación con este método fue del 100%. La reproducibilidad de los patrones obtenidos fue comprobada repitiendo dos veces la PCR, obteniéndose en ambas ocasiones el mismo patrón para cada aislado.

Mediante la amplificación de fragmentos de 7 genes (5 loci) que contenían diferente número de repeticiones dispuestas en tándem, obtuvimos diferentes patrones de bandas que se analizaron visualmente. En todos los aislados se obtuvo la amplificación de 6 a 7 bandas dependiendo de si en el locus *sdr* se amplificaron los tres genes C, D y E, o solamente dos de ellos (Josefsson *et al.*, 1998). Se planteó diferenciar los aislados pero no establecer una relación clonal entre ellos. Dado el pequeño número de *S. aureus* analizados fue posible llevar a cabo un análisis visual de los patrones.

Se identificaron 7 perfiles diferentes que se consideraron distintos según lo descrito previamente (Sabat *et al.*, 2003; Rivero-Pérez., *et al* 2010) (Figura14). Los genotipos a, b y c se obtuvieron en más de un aislado: a (4 aislados), b (2 aislados) y c (2 aislados), mientras que los genotipos d, e, f y g únicamente se detectaron en un único aislado. No se encontró el mismo genotipo en aislados SASM y SARM. Los genotipos a, c, g y f fueron encontrados en aislados SARM, mientras que el b, d y e de SASM (Tabla 6).

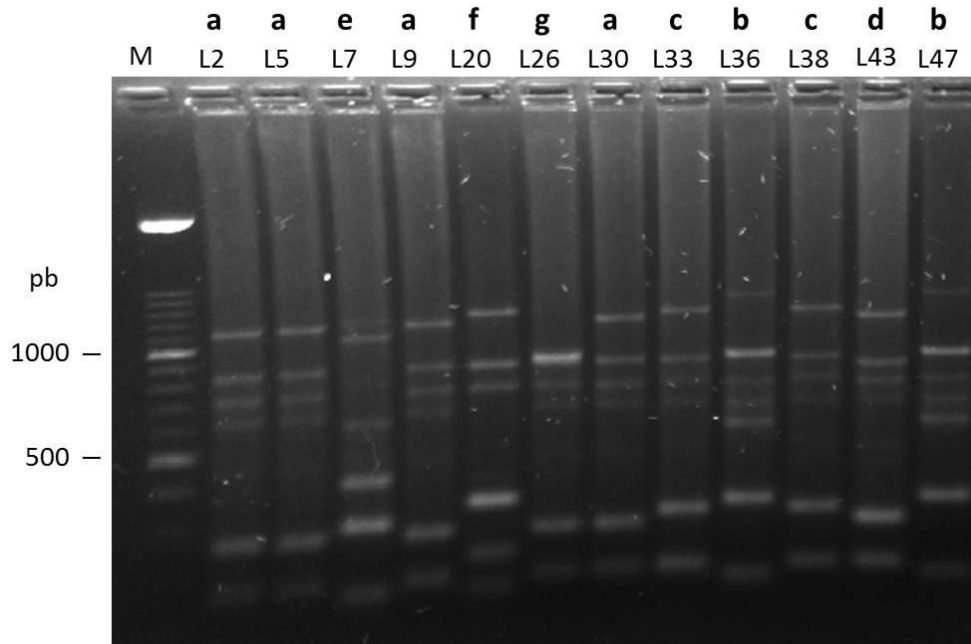


Fig. 14. Perfiles de amplificación MLVA.. Encima del nombre de cada aislado se indican los genotipos MLVA. M: marcador de peso molecular XIV (Roche).

4.5.1. Distribución clonal de los elementos portadores del gen *ileS2*.

El análisis de los diferentes elementos portadores del *ileS2* en el contexto de los genotipos de *S. aureus* (clones) definidos mediante MLVA permitió obtener información preliminar valiosa sobre el modo de dispersión de la Hi-Mup^R. La detección de elementos portadores del gen *ileS2* con diferentes configuraciones IS257-*ileS2* en los 12 aislados de *S. aureus* estudiados indica el importante papel que dichos elementos han desempeñado. Algunos elementos (configuraciones IS257-*ileS2* tipo I y II) se detectaron en aislados con diferentes genotipos, lo que sugiere que la transferencia horizontal de dichos elementos (probablemente plásmidos) ha contribuido en la dispersión de la resistencia. Además, la detección de varios aislados perteneciente a un mismo genotipo MLVA portadores de un mismo tipo de elemento portador del gen *ileS2* (por ejemplo, aislados con genotipo MLVA tipo a y patrón IS257-*ileS2* tipo I) indica el papel desempeñado por la diseminación clonal en la expansión de la resistencia (Tabla 6) Al igual que en este estudio, tanto la transferencia horizontal como diseminación clonal de diferentes cepas se han asociado a la dispersión de la Hi-Mup^R (Chaves *et al.*, 2004; González-Domínguez *et al.*, 2016; Pérez-Roth *et al.*, 2013).

5. Conclusiones

1. La asociación establecida entre la Hi-Mup^R y la resistencia a otros antibióticos, por ejemplo a los aminoglucósidos, tiene importantes implicaciones clínicas ya que puede ser la responsable de procesos de co-selección de las resistencias a dichos antibióticos.
2. La correlación existente entre el fenotipo Hi-Mup^R y la presencia del gen *ileS2* está en consonancia con la mayor parte de estudios previos que establecen que dicho gen es el principal responsable de la resistencia.
3. La detección de diferentes configuraciones de las regiones IS257-*ileS2* sugiere la existencia de diferentes elementos genéticos portadores del gen *ileS2*.
4. Tanto la transferencia génica horizontal como la diseminación clonal parecen haber contribuido al surgimiento y dispersión de la Hi-Mup^R.
5. Una limitación es que únicamente se analizó una muestra aleatoria de los aislados Hi-Mup^R y no se estudiaron en detalle los elementos genéticos portadores del gen *ileS2*. Así, los resultados no permitieron obtener un conocimiento completo de la Hi-Mup^R.

Conclusions

1. The established association between high-level mupirocin resistance and the resistance to other antibiotics, for example to aminoglycosides, has important clinical implications as it may be responsible for co-selection processes of antibiotic resistances.
2. The correlation between the high-level mupirocin resistance phenotype and the presence of the *ileS2* gene is in line with the majority of previous studies that establish that *ileS2* is responsible for Hi-Mup^R.
3. The detection of different IS257-*ileS2* amplification patterns indicates the existence of different genetic elements carrying the *ileS2* gene.
4. Both horizontal gene transfer and clonal dissemination appear to have contributed to the emergence and dispersion of Hi-Mup^R.
5. A limitation is that only a random sample of the Hi-Mup^R isolates was analyzed and the genetic elements carrying the *ileS2* were not studied in detail. Therefore, the results did not allow obtaining a thorough knowledge of the Hi-Mup^R.

6. Bibliografía

- Anthony, R. M., A. M. Connor, E. G. M. Power, and G. L. French.** 1999. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**: 30-34.
- Antonio, M., N. McFerran y M. J. Pallen.** 2002. Mutations affecting the Rossman fold of isoleucyl-tRNA synthetase are correlated with low-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 438-42.
- Barber, M. y M. Rozwadowska-Dowzenko.** 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* **ii**: 641-4.
- Bradley SF, Ramsey MA, Morton TM, Kauffman CA.** 1995. Mupirocin resistance: clinical and molecular epidemiology. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **16**(6):354-8.
- Brignoli T, Manetti AGO, Rosini R, et al.** 2019. Absence of Protein A Expression Is Associated With Higher Capsule Production in Staphylococcal Isolates. *Front Microbiol.*
- Cadilla A, David MZ, Daum RS, Boyle-Vavra S.** 2011. Association of high-level mupirocin resistance and multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at an academic center in the midwestern United States. *J Clin Microbiol.* **49**(1):95-100.
- Carter GP, Schultz MB, Baines SL, et al.** 2018. Topical Antibiotic Use Coselects for the Carriage of Mobile Genetic Elements Conferring Resistance to Unrelated Antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **62**(2).
- Chaves F, García-Martínez J, de Miguel S, Otero JR.** 2004. Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from nasal samples. *J Clin Microbiol.* **42**(2):822-4.
- Cookson, B. D.** 1998. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 11-18.
- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, et al.** 2008. *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **26**(5):269-77.
- Dadashi M, Hajikhani B, Darban-Sarokhalil D, van Belkum A, Goudarzi M.** 2019. Mupirocin Resistance in *Staphylococcus aureus*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Glob Antimicrob Resist.*
- de Jong NWM, van Kessel KPM, van Strijp JAG.** 2019 Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.* **7**(2)
- Driscoll DG, Young CL, Ochsner UA.** 2007. Transient loss of high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* due to *MupA* polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**(6):2247-8.
- Finlay JE, Miller LA, Poupard JA.** 1997. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**(5):1137-9.
- Firth N, Jensen SO, Kwong SM, Skurray RA, Ramsay JP.** 2018. Staphylococcal Plasmids, Transposable and Integrative Elements. *Microbiol Spectr.* **6**(6).
- Foster TJ.** 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* **41**(3):430-449.
- Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, et al.** 2013. Mupirocin and chlorhexidine resistance in *Staphylococcus aureus* in patients with community-onset skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**(1):559-68.
- Gilbart, J., C. R. Perry y B. Slocombe.** 1993. High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: evidence for two distinct isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 32-8.

- González-Domínguez M, Seral C, Potel C, et al.** 2016. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones with high-level mupirocin resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **85**(2):213-7.
- Hodgson, J. E., S. P. Curnock, K. G. H. Dyke, R. Morris, D. R. Sylvester y M. S. Gross.** 1994. Molecular characterization of the gene encoding high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* J2870. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1205-8.
- Huskisson, S. C. y G. Waincott.** 1984. A comparative trial of mupirocin and chlortetracycline in general practice and children's casualty department. En *Mupirocin. A Nobel Topical Antibiotic* (Wilkinson, D. S y J.D. Price., eds.), pags. 109-13. Royal Society of Medicine, London.
- Jevons, MP, Coe AW, Parker MT.** 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet.* **1**(7287):904-7.
- Josefsson E, McCrea KW, Ní Eidhin D, et al.** 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* **144**: 3387-95.
- Lakhundi S, Zhang K.** 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* **31**(4).
- Liu J, Chen D, Peters BM, et al.** 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog.*
- McClure JA, Zaal DeLongchamp J, Conly JM, Zhang K.** 2017. Novel Multiplex PCR Assay for Detection of Chlorhexidine-Quaternary Ammonium, Mupirocin, and Methicillin Resistance Genes, with Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Microbiol.* **55**(6):1857-1864.
- McDougal, L. K., Fosheim, G. E., Nicholson, A., Bulens, S. N., Limbago, B.M., Shearer, J. E. et al.,** 2010. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 3804-3811.
- Miao J, Chen L, Wang J, et al.** 2017. Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microb Pathog.*
- Morton TM, Johnston JL, Patterson J, Archer GL.** 1995. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(6):1272-80.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A.** 2015. *Medical microbiology.* Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Palepou MF, Johnson AP, Cookson BD, Beattie H, Charlett A, Woodford N.** 1998. Evaluation of disc diffusion and Etest for determining the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to mupirocin. *J Antimicrob Chemother.* **42**(5):577-83.
- Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO.** 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* **31**(4).
- Pérez-Roth E, Kwong SM, Alcoba-Florez J, Firth N, Méndez-Alvarez S.** 2010. Complete nucleotide sequence and comparative analysis of pPR9, a 41.7-kilobase conjugative staphylococcal multiresistance plasmid conferring high-level mupirocin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**(5):2252-7.
- Pérez-Roth E, Potel-Alvarellos C, Espartero X, Constela-Caramés L, Méndez-Álvarez S, Alvarez-Fernández M.** 2013. Molecular epidemiology of plasmid-mediated high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in four Spanish health care settings. *Int J Med Microbiol.* **303**(4):201-4.
- Pérez-Roth E.,** 2006. *Staphylococcus aureus resistentes a la meticilina: tipificación molecular y transferencia génica de la resistencia a mupirocina.* Tesis doctoral. Universidad de La Laguna, España.
- Pérez-Roth E., Armas-González, E. Alcoba-Flórez, J., Méndez-Álvarez, S.** 2011. PCR-based amplification of heterogeneous IS257-ileS2 junctions for molecular monitoring of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **66**: 471-475.

- Pérez-Roth E., F. Claverie-Martín, J. Villar y S. Méndez-Álvarez.** 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4037-41.
- Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H.** 2015. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *J Antimicrob Chemother.* **70**(10):2681-92.
- Rahman, M., W. C. Noble y B. D. Cookson.** 1987. Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **ii**:387.
- Reta A, Mengist A, Tesfahun A.** 2019. Nasal colonization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **18**(1):25
- Rivero-Pérez B, Pérez-Roth E, Méndez-Alvarez S.** 2010. Evaluation of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for typing a polyclonal hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* population in an area where such infections are endemic. *J Clin Microbiol.* **48**(8):2991-4.
- Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Alvarez-Lerma F, et al.** 2008. Surveillance and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals. A GEIH-SEIMC and SEMPSPH consensus document. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **26**(5):285-98.
- Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, et al.** 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol.* **41**(4):1801-4.
- Seah C, Alexander DC, Louie L, et al.** 2012. *MupB*, a new high-level mupirocin resistance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(4):1916-20.
- Sievers F, Higgins DG.** 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* **27**(1):135-145.
- Tam K, Torres VJ.** 2019. *Staphylococcus aureus*. Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr.* **7**(2).
- Thomas CM, Hothersall J, Willis CL, Simpson TJ.** 2010. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. *Nat Rev Microbiol.* **8**(4):281-9.
- Trouillet-Assant S, Flammier S, Sapin A, et al.** 2015. Mupirocin Resistance in Isolates of *Staphylococcus* spp. from Nasal Swabs in a Tertiary Hospital in France. *J Clin Microbiol.* **53**(8):2713-5.
- Udo, E. E., N. Al-Sweih y B. C. Noronha.** 2003. A chromosomal location of the *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1283-6.
- Williamson DA, Carter GP, Howden BP.** 2017. Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. *Clin Microbiol Rev.* **30**(3):827-860.
- Woodford, N., A. P. Watson, S. Patel, M. Jevon, D. J. Waghorn y B. D. Cookson.** 1998. Heterogeneous location of the *mupA* high-level mupirocin resistance gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **47**: 829-35.
- Wuite J, Davies BI, Go M, Lambers J, Jackson D, Mellows G.** 1983. Pseudomonic acid: a new topical antimicrobial agent. *Lancet.* **2**(8346):394.