

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/24
I.S.B.N.: 978-84-15910-21-3

BELINDA RIVERO PÉREZ

**Caracterización de aislados
de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina
adquiridos en la comunidad en la isla de Tenerife**

Director
SEBASTIÁN A. MÉNDEZ ÁLVAREZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el grupo de Microbiología Molecular, dentro del Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, al cual he estado vinculada durante los últimos 5 años. Esta vinculación me ha permitido realizar el trabajo puesto de manifiesto en la presente memoria, en la que han colaborado los integrantes del grupo antes mencionado. Sin embargo, quiero mencionar a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar a mi director de tesis, Sebastián Méndez, fundamentalmente por darme la posibilidad de incorporarme a un grupo de investigación y aportarme las herramientas necesarias para el desarrollo satisfactorio de esta tesis. Gracias por confiar en mí, y ayudar a sentirme la principal protagonista de mi trabajo.

A Federico Laich por guiar mis primeros pasos en el laboratorio. Gracias Fede por recibirme con los brazos abiertos, por ser mi mejor maestro, explicándome todo en detalle, por tantos ratos de charlas científicas y filosóficas, y en definitiva, porque a la ilusión de los primeros meses en la Unidad, se sumó la mejor de las compañías, la tuya.

A Teresa Giráldez por hablarme con franqueza y apoyarme en la recta final que han supuesto estos últimos meses. Gracias a Carlos Flores y Diego Álvarez por ayudarme con la parte final de mi tesis, totalmente nueva para mi, y en la que ustedes tienen una gran trayectoria. Gracias por las discusiones e ideas que han dado un matiz interesante a esta parte del trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros de la Unidad, porque de cada uno he aprendido algo útil para mi trabajo o para mi vida. En especial a aquellas personas que han hecho más ligeras mis fatigas, sobre todo en estos últimos meses, y que ya no considero compañeros, sino amigos: a Violeta, Oliver, Jonay, María del Mar, Marialbert, Ana, Almudena, Isa, María... Gracias, porque, a pesar de que las circunstancias han hecho que en muchos momentos la soledad fuera mi única compañera de trabajo, ustedes han estado siempre conmigo apoyándome, compartiendo lágrimas y alegrías, datos y barraquitos, y sobre todo, dándome fuerzas para continuar el camino. Sin duda, parte del mérito de este trabajo es de ustedes.

A mis amigos, que, a pesar de no pertenecer a este complicado mundo de la investigación, siempre han mostrado interés y han estado cuando los he necesitado. En especial, gracias Laura porque a pesar de que la vida nos ha tenido físicamente distanciadas en varias ocasiones, has sabido estar ahí siempre, por entender mi falta de tiempo, por saber encontrar el huequito para dedicarme, y porque tu ánimo ha sido imprescindible en mi lucha diaria. Gracias Noe por tu presencia constante, por considerarme como una hermana y así hacérmelo sentir, y sobre todo, por apoyarme durante todos estos años en mis peores momentos, no solo profesionales, sino personales.

A mi familia, porque, sin duda, a ellos les debo lo que soy. Su apoyo incondicional ha hecho posible que, en momentos de desánimo, me levantara con fuerzas para afrontar el día a día. Especialmente, gracias mamá, por siempre, siempre, siempre, estar disponible para mi; por esperar en casa mi llegada del colegio, del instituto, de la universidad, del laboratorio...y escuchar pacientemente mi relato de cada día, desde temarios de asignaturas hasta resultados en los experimentos, etc. Si durante estos 5 años no he tirado la toalla ha sido, definitivamente, gracias a tu empuje, a que siempre me has hecho ver las cosas desde otro punto de vista, a que con tu ejemplo, me has hecho ser luchadora, y de tu mano el camino hasta aquí ha sido más liviano.

A Javier, porque ha sido el espejo en el que me he mirado para saber cómo andar en este mundo, cómo ser constante y responsable con mi trabajo. Sin embargo, eso es lo menos importante de entre todas las cosas que me has dado. Gracias por estar siempre a mi lado, por implicarte en mis cosas como si fueran tuyas, por ser el hombro en el que descanso, por compartir tu vida con la mía, y sobre todo, por darme lo mejor que me ha pasado: ser mamá. Gracias Paula porque tu presencia ya ha transformado mi vida.

Belinda Rivero Pérez

La Laguna Abril de 2012

A mis padrinos

CONTENIDOS

	Página
Capítulo 1	
Evaluación del análisis de repeticiones en tándem en número variable en múltiples <i>locus</i> para tipificar una población de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina adquiridos en el Hospital	1
1.1 Introducción	5
1.1.1 Importancia de la tipificación de SARM	5
1.1.2 Métodos de tipificación	8
1.1.3 Elección del método adecuado	14
1.1.4 Comparación del MLVA con otros métodos establecidos	17
1.2. Objetivos	21
1.3. Materiales y Métodos	22
1.3.1 Aislados clínicos y período de estudio	22
1.3.2 Caracterización previa de los SARM-AH	22
1.3.3 Optimización del MLVA	23
1.3.4 Análisis de los patrones de MLVA	24
1.3.5 Comparación de los resultados obtenidos mediante MLVA con los datos	
PFGE/ST-SCC _{mec}	25
1.4. Resultados	27
1.4.1 Punto de corte con una banda de diferencia	27
1.4.2 Punto de corte de similitud $\geq 80\%$	28

1.4.3 Punto de corte de similitud $\geq 70\%$	30
1.5. Discusión	31
1.5.1 Punto de corte con una banda de diferencia	34
1.5.2 Punto de corte de similitud $\geq 80\%$	35
1.5.3 Punto de corte de similitud $\geq 70\%$	36
1.6 Conclusiones	38
1.7 Bibliografía	39
1.8 Anexos	48
1.8.1 Dendrograma	48
1.8.2 Índice de abreviaturas	54
1.8.3 Publicación relacionada	56
Capítulo 2	
Epidemiología molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina asociados a la comunidad en la isla de Tenerife	61
2.1 Introducción	71
2.1.1 Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
2.1.2 Genoma	73
2.1.2.1 Genoma central	74
2.1.2.2 Genoma accesorio	74
2.1.3 Proceso de infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	79
2.1.4 Evolución de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
2.1.4.1 Adquisición de resistencias	83

2.1.4.1.1 Resistencia a la meticilina	84
2.1.4.1.2 Resistencia a la mupirocina	89
2.1.4.2 Emergencia de SARM en la comunidad	92
2.1.5 Prevención de infecciones por SARM-AC	103
2.2 Objetivos	106
2.3 Materiales y métodos	107
2.3.1 Aislados clínicos, pacientes y período de estudio	107
2.3.2 Identificación fenotípica	109
2.3.3 Pruebas de sensibilidad antibiótica	109
2.3.4 Identificación molecular de los SARM	110
2.3.5 Detección de los genes codificantes de las toxinas PVL y Hlg- γ mediante PCR	112
2.3.6 Confirmación de genes mediante secuenciación	113
2.3.7 Determinación de la localización del gen <i>ileS2</i>	116
2.3.8 Análisis de expresión del gen <i>ileS2</i>	120
2.3.9 Identificación mediante PCR del tipo estructural de <i>SCCmec</i>	124
2.3.10 Métodos de tipificación molecular	128
2.3.10.1 Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	128
2.3.10.2 Análisis de repeticiones en tandem en número variable en varios <i>loci</i>	132
2.3.10.3 Tipificación <i>spa</i>	132
2.3.10.4 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	134
2.4 Resultados	136
2.4.1 Aislados clínicos, pacientes y período de estudio	136

2.4.2 Infecciones	137
2.4.3 Patrones de susceptibilidad antimicrobiana	138
2.4.4 Resistencia altas concentraciones de mupirocina	139
2.4.5 Expresión del gen <i>ileS2</i>	140
2.4.6 Toxinas	144
2.4.7 Tipificación	145
2.5 Discusión	153
2.6 Conclusiones	164
2.7 Bibliografía	166
2.8 Anexos	212
2.8.1 Índice de abreviaturas	212
2.8.2 Tablas de cebadores	215
2.8.3 Publicación relacionada	219

Capítulo 1

Evaluación del análisis de repeticiones en tándem en número variable en múltiples locus para tipificar una población de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina adquiridos en el Hospital

Tabla de contenidos

1.1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.1. Importancia de la tipificación de SARM.....	5
1.1.2. Métodos de tipificación	8
1.1.3. Elección del método adecuado	14
1.1.4. Comparación del MLVA con otros métodos establecidos.....	17
1.2. OBJETIVOS	21
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1.3.1. Aislados clínicos y período de estudio	22
1.3.2. Caracterización previa de los SARM-AH.....	22
1.3.3. Optimización del MLVA.....	23
1.3.4. Análisis de los patrones de MLVA.....	24
1.3.5. Comparación de los resultados obtenidos mediante MLVA con los datos PFGE/ST-SCC<i>mec</i>	25
1.4. RESULTADOS	27
1.4.1. Punto de corte con una banda de diferencia.....	27
1.4.2. Punto de corte de similitud $\geq 80\%$	28
1.4.3. Punto de corte de similitud $\geq 70\%$	30
1.5. DISCUSIÓN.....	31
1.5.1. Punto de corte con una banda de diferencia.....	34
1.5.2. Punto de corte de similitud $\geq 80\%$	35
1.5.3. Punto de corte de similitud $\geq 70\%$	36
1.6. CONCLUSIONES	38
1.7. BIBLIOGRAFÍA	39
1.8. ANEXOS	48
1.8.1. Dendrograma	48
1.8.2. Índice de abreviaturas.....	54
1.8.3. Publicación relacionada	56

Tabla de Figuras

Figura 1. 1. Representación propuesta por Chaberny <i>et al.</i> con la que se ejemplifican los casos de colonización frente a los de infección por SARM ¹⁸	7
Figura 1. 2. Representación esquemática del análisis <i>spa typing</i> , donde a cada repetición de aminoácidos se le asigna un nombre, por ejemplo, r26; y la combinación de todas las repeticiones presentes da lugar a un tipo de <i>spa</i> , en el esquema t001.	11
Figura 1. 3. Representación del CC30, mediante el empleo del programa informático BURST (A) y de su versión mejorada eBURST (B). Ambas muestran el ancestro común, los ST que son SLV y DLV de él.	12
Figura 1. 4. Esquema que representa la estructura general que compone los distintos tipos de SCC <i>mec</i>	13
Figura 1. 5. Visión del recubrimiento de <i>S. aureus</i> , propio de una bacteria Gram positiva, en el cual se aprecian las partes de las que constan los factores de aglutinación, tanto A como B.	19
Figura 1. 6. Esquema del programa de amplificación optimizado para el MLVA.	23
Figura 1. 7. Interferencia que presenta el colorante xileno cianol con las bandas de mayor tamaño.	24
Figura 1. 8. A. Clasificación del clon Ibérico, PFGE A1/ST247-IA y B. del clon epidémico EMRSA16, PFGE A1/ST36-II, según el MLVA analizado bajo los tres puntos de cortes distintos empleados en este trabajo ($a=1$ banda, $b=80\%$ y $c=70\%$), así como su relación con otros subtipos del mismo grupo.	29
Figura 1. 9. Mal resultado del MLVA debido a la realización de la mezcla de PCR para un número de muestras superior a 15. Recuadrados en rojos se observan los dímeros de cebadores.	32
Figura 1. 10. Fragmento de un gel de electroforesis donde se pueden observar distintos patrones de bandas. El carril M muestra el marcador XIV (Roche Diagnostics, Suiza), los carriles 1 y 3 muestran patrones con 6 bandas; el 2 muestra solo 5 bandas; y, finalmente el carril 4 muestra un perfil completo con las 7 bandas del MLVA.	33

1.1. INTRODUCCIÓN

Cuando se decide investigar todos los aislados recuperados de una especie bacteriana determinada en un periodo de tiempo, como es nuestro caso, se debe caracterizar cada uno de estos aislados de forma independiente para poder sacar conclusiones a nivel colectivo. Para ello, el primer paso en este tipo de estudio consiste en elegir entre las técnicas empleadas por la comunidad científica para caracterizar un microorganismo en concreto, *Staphylococcus aureus* en nuestro estudio. Debido a la importancia de esta bacteria a nivel clínico, el número de técnicas descritas es elevado y la elección de los métodos adecuados no es trivial.

1.1.1. Importancia de la tipificación de SARM

Debido a la importancia que ha adquirido *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) como patógeno en las últimas décadas en todo el mundo^{1,2}, se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de métodos de tipificación para esta bacteria. La tipificación es la caracterización de cada aislado, de forma que sea posible diferenciar distintas cepas dentro de la misma especie bacteriana. Por lo tanto, la tipificación permite detectar la existencia de un brote y su expansión, conocer el método de transmisión de la cepa, y finalmente establecer las medidas oportunas, tanto para frenar la propagación de la infección, como para prevenir que vuelva a producirse un brote. Su utilidad radica en que los brotes producidos por SARM son debidos, la mayoría de las veces, a la expansión clonal de una cepa en particular, refiriéndonos a una expansión clonal cuando existe identidad fenotípica y genotípica entre aislados de diversas fuentes, localizaciones y/o momentos³. Dicho de otro modo, los aislados de la cepa que está produciendo el brote tienen un ancestro común y presentarán el mismo genotipo, el cual será distinto del de aquellos aislados no relacionados epidemiológicamente⁴. Aunque, con respecto a este último punto, se debe tener en cuenta que aislados no relacionados epidemiológicamente podrían presentar el mismo genotipo si la diversidad genética se encuentra limitada dentro de la especie en el espacio y tiempo escogidos⁵. En definitiva,

aquellos métodos que nos sirvan para identificar diferentes cepas de SARM, nos ayudarán a controlar su expansión o la aparición de brotes producidos por ellas.

Diversos estudios han demostrado que la aparición de infecciones nosocomiales causadas por *S. aureus* supone un aumento de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes, así como un incremento en los costes hospitalarios⁶⁻¹². En particular, Abramson *et al.* publicaron un estudio en 1999 donde analizaron los datos relativos a la morbilidad de los pacientes con infecciones nosocomiales en el torrente sanguíneo cuyo agente causal era *S. aureus*, así como los costes extras derivados de tales infecciones. Los autores observaron un incremento en la morbilidad de los pacientes, así como en los gastos derivados de la estancia prolongada en el hospital. Además, calcularon de forma teórica que el hospital se hubiera ahorrado durante el periodo de estudio (desde diciembre de 1993 hasta marzo de 1995) 321.705 \$ (251.867 €) en costes directos variables si los 19 pacientes que formaron parte del estudio no hubieran adquirido la infección⁹. Además observaron diferencias dentro de los costes del hospital, siendo mayores al tratarse de una infección por SARM en lugar de un SASM (*S. aureus* Susceptible a Meticilina), probablemente como consecuencia de los antibióticos prescritos en cada caso. Esta diferencia, en morbilidad y gastos hospitalarios entre las cepas sensibles a meticilina y aquellas resistentes a ella, fue también observada posteriormente por Cosgrove *et al*¹¹.

Del mismo modo que se ha demostrado que la adquisición de infecciones nosocomiales producidas por *S. aureus* producen un incremento en los costes del hospital, y en la morbilidad y mortalidad de los pacientes, también se ha comprobado que la realización de análisis de rutina, fundamentalmente en la admisión de los pacientes, supone una reducción de los niveles de estos tres importantes aspectos. Los pacientes de las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), así como aquellos que van a ser sometidos a alguna operación, presentan una mayor probabilidad de sufrir infecciones nosocomiales producidas por este patógeno, motivo por el cual, varios autores han planteado la utilidad de realizar este control rutinario, al menos, en estos pacientes que presentan mayor susceptibilidad^{11, 13-18}. Se ha realizado una interesante comparación entre el origen de la expansión de SARM y un iceberg; donde la punta de éste corresponde con los casos clínicos de infecciones, mientras que el resto de la masa de hielo representa los casos desconocidos de colonización¹⁸ (Figura 1. 1). Por lo que, la realización de cultivos de vigilancia que ayuden a identificar los casos de colonización,

que constituyen la mayoría del reservorio para la transmisión de aislados SARM entre personas, permitirá establecer las barreras adecuadas para evitar su expansión.



Figura 1. 1. Representación propuesta por Chaberny *et al.* con la que se ejemplifican los casos de colonización frente a los de infección por SARM¹⁸.

En su estudio, Chaberny *et al.* no consiguieron eliminar totalmente las infecciones nosocomiales producidas por SARM, hecho que es atribuido a que el control de rutina no se realizó en el 100% de los casos de admisión de los pacientes en las UCIs y salas quirúrgicas, además de que no fue realizado en todas las áreas del hospital. Aun así, observaron una relación directa entre el establecimiento de la revisión rutinaria y una disminución de la incidencia de este tipo de infecciones¹⁸. Por lo tanto, existen indicios suficientes para pensar que la tipificación es importante para controlar la expansión de cepas de SARM, pero no solo dentro del hospital, sino también en la comunidad.

No obstante, aunque se ha demostrado que la búsqueda rutinaria de SARM en los pacientes de nuevo ingreso reduce los costes hospitalarios derivados de las infecciones nosocomiales producidas por este patógeno, esto también supone una inversión inicial de material y personal, que no siempre puede ser asumida por el centro. Por este motivo, debe elegirse el método de tipificación más adecuado para cada hospital, en función de la economía, del volumen de trabajo y de la preparación del personal encargado de esa labor.

1.1.2. Métodos de tipificación

En sus orígenes, la clasificación de *S. aureus*, y de todas las especies en general, se realizaba en base a sus características fenotípicas. Por ejemplo, las bacterias se pueden clasificar según el método de tinción de Gram y por la forma y agrupación de las células, por sus propiedades hemolíticas en un medio de agar sangre, por la pigmentación, el tamaño y la forma de las colonias, etc. Los principales métodos fenotípicos de tipificación son los siguientes:

1. Serotipificación: Es el método más antiguo, publicado en 1968, y está basado en la diferenciación de cepas en base a los antígenos de superficie que poseen, mediante reacciones antígeno-anticuerpo¹⁹. Se utilizan anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno; de forma que si se producen mutaciones puntuales que alteren su secuencia o estructura, éste ya no es reconocido por el anticuerpo inicial y pasa a ser reconocido por otro anticuerpo diferente. Éste es un método muy laborioso que consume mucho tiempo.
2. Tipificación fágica: Técnica que comenzó a emplearse para caracterizar aislados de *S. aureus* en 1942²⁰. Se basa en que los aislados son diferenciados por su susceptibilidad o resistencia a la lisis causada por cada miembro de un grupo de fagos. La especificidad de esta técnica está basada en la especificidad del receptor en la adsorción, la restricción del ADN, la inmunidad en la superinfección y mecanismos de interferencia post-adsorción. Mejora al anterior método pues tiene un mayor poder de discriminación. Sin embargo, a pesar de que ha sido optimizada por varios autores, sigue siendo una técnica limitada²¹⁻²³. El motivo es que muchas cepas de *S. aureus* son lisogénicas, y los profagos influyen en los patrones de tipificación por inmunidad a la superinfección y en la restricción del ADN; y en consecuencia, son frecuentes las variaciones en estos casos.
3. Resistotipificación: Esta técnica, descrita para *S. aureus* en 1974, se basa en la resistencia que presenta esta bacteria frente a metales pesados, como el cadmio y el mercurio, y también a sustancias químicas, como la acriflavina y el 3-aminofenol. Estos patrones de resistencia son usados para diferenciar cepas. No obstante, muchas de estas resistencias están codificadas en plásmidos por lo que pueden perderse o ganarse, lo que compromete la estabilidad de la técnica²⁴.

Aunque algunos de estos métodos fenotípicos continúan siendo utilizados en los laboratorios de microbiología clínica, sólo permiten realizar una clasificación muy somera de las bacterias, que, como se ha visto, en ocasiones conduce a errores. Desde los años 70, con el desarrollo de la biología molecular, cada vez resulta más evidente que el fenotipo no es más que una manifestación del genotipo. Tal y como Goering y Ruff propusieron, la transición desde el genotipo hasta el fenotipo es un proceso a través de múltiples pasos, mientras que el genoma es la molécula de identidad fundamental²⁵. Por lo tanto, resulta imprescindible tipificar mediante técnicas genotípicas, que poseen un poder de discriminación mayor y una mayor precisión, en relación a las fenotípicas. En general, la tipificación genotípica utiliza un fragmento del genoma del microorganismo, por lo que elegir una región con la variabilidad adecuada es la clave para el éxito del método. Además, dentro de los métodos genotípicos también ha habido una evolución, de hecho, Goering y Ruff distinguen entre métodos de primera a cuarta generación. Los métodos de primera generación son aquellos basados en el análisis del contenido plasmídico; los de segunda son los basados en las enzimas de restricción y sondas; consideraron de tercera generación a la electroforesis en campo pulsado y aquellos basados en PCRs (del inglés *Polymerase Chain Reaction*); y finalmente, la cuarta generación corresponde con la secuenciación de ADN²⁵. Dentro de esta clasificación los principales métodos genotípicos son:

1. Análisis con patrones plasmídicos: Método de primera generación, que se basa en que las cepas de *S. aureus* difieren en el número y tamaño de sus plásmidos, los cuales son fácilmente detectables en geles de agarosa. El poder de discriminación de esta técnica es bajo, aunque se puede mejorar mediante el uso de enzimas de restricción que corten dichos plásmidos ofreciendo diferentes patrones. Aun así, el valor de esta técnica continúa siendo limitado puesto que los plásmidos son susceptibles a perderse o ganarse, restándole reproducibilidad al método²⁶.
2. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción: Es una técnica de segunda generación, que está basada en la distribución al azar de sitios de corte de endonucleasas de restricción en el genoma bacteriano, lo cual se refleja en la longitud de los fragmentos obtenidos. Cuando la enzima de restricción actúa sobre todo el genoma de *S. aureus*, se convierte en una técnica de tercera

generación denominada PFGE (del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), y es actualmente la técnica por excelencia para la tipificación de esta bacteria. En este caso se usa la enzima *SmaI*, que tiene baja frecuencia de corte, y produce de 8 a 20 fragmentos de restricción en un rango de 8 a 800 Kb de tamaño. Los fragmentos generados son grandes y, por lo tanto, son resueltos en electroforesis de campo pulsado, de ahí el nombre de la técnica. Las diferencias que presentan las cepas en cuanto a tamaño y número de bandas son debidas a mutaciones puntuales que cambian el sitio de corte de la enzima, o a inserciones, deleciones o transposiciones. Debido a estos eventos genéticos, los patrones de PFGE se pueden alterar durante el curso de un brote, por lo que es necesario conocer cómo afectan estos cambios a los patrones de cada aislado. Se considera que de 1 a 3 bandas de diferencia es debido a variaciones dentro del mismo grupo clonal, de 4 a 6 indican subclones incluidos también dentro del mismo grupo clonal, y en 7 ó más se diferenciarían clones no relacionados. Los resultados de esta técnica son altamente reproducibles⁵. No obstante, se debe tener en cuenta que esta técnica es útil para comparar aislados SARM únicamente a nivel local y en un corto periodo de tiempo²⁷, ya que la comparación de los patrones de bandas entre distintos laboratorios y diferentes países no es susceptible de fiabilidad.

3. Tipificación mediante PCR: Existen varias PCRs descritas para la caracterización de *S. aureus*, todas ellas consideradas técnicas de tercera generación. Una de las desarrolladas más recientemente, y en la que nos centraremos, ya que va a ser empleada en este estudio, es la que está basada en secuencias repetidas en el genoma, conocida como análisis de secuencias repetidas en tándem en número variable en varios *loci* o MLVA (del inglés *Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Assay*)²⁸. Las variaciones en el número de estas repeticiones darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños, y estas diferencias son las que se emplean en el MLVA para establecer relaciones filogenéticas. Los 5 *loci* que se estudian en esta técnica contienen 7 genes que codifican proteínas implicadas en la virulencia de la bacteria. En resumen, este análisis discrimina entre los diferentes aislados de *S. aureus* basándose en el patrón de bandas que ofrece cada uno en función del número de repeticiones en tándem de estos 7 genes individuales. Al tratarse del análisis de patrones de

bandas, con esta técnica ocurre como con el PFGE, su aplicación se ve reducida a comparaciones locales realizadas en un periodo de tiempo relativamente corto.

4. Análisis de secuencias repetidas de la proteína A (*spa typing*): Esta técnica es de cuarta generación, pues consiste en la secuenciación de la región polimórfica del gen que codifica para la proteína A. Esta región, denominada X, está formada normalmente por 24 pb, con excepciones de 21 a 30 pb, repetidas un número de veces variable²⁹. Se encuentra localizada corriente arriba de la secuencia que codifica para la región del extremo carboxilo terminal de la proteína, que es la encargada del anclaje a la pared celular^{30,31}. Por lo tanto, la región repetida parece que debe servir para extender la región del extremo amino terminal de unión a la IgG a través de la pared celular³². Las variaciones en la región X son debidas tanto a mutaciones puntuales, como a pérdidas o ganancias de repeticiones, cada repetición tiene asignado un código alfa-numérico, y el tipo *spa* viene dado por el orden de repeticiones específicas (Figura 1. 2).

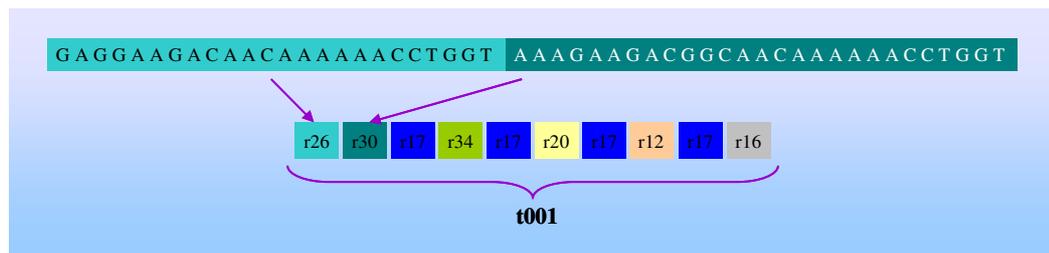


Figura 1. 2. Representación esquemática del análisis *spa typing*, donde a cada repetición de aminoácidos se le asigna un nombre, por ejemplo, r26; y la combinación de todas las repeticiones presentes da lugar a un tipo de *spa*, en el esquema t001.

Éste es un método con un alto poder de discriminación, fácil de realizar, que permite la portabilidad de los datos entre laboratorios. Además, se ha desarrollado una base de datos de secuencias *spa* que facilita el análisis y centraliza los datos referidos a esta técnica (<http://www.ridom.de/spa-server/>)³³.

5. Tipificación mediante secuenciación de varios loci: MLST (del inglés *Multi-Locus Sequence Typing*): Este método, considerado por Goering y Ruff de cuarta generación²⁵, surge de la necesidad de realizar comparaciones a nivel global. En esta técnica, nos centramos en el genoma central de la bacteria, y más concretamente en 7 genes constitutivos o *housekeeping*, necesarios para la supervivencia de la bacteria. Se amplifica un fragmento interno de

aproximadamente 450 pb de cada gen, que será posteriormente secuenciado. Los siete genes son: carbamato quinasa (*arcC*), shiquimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol quinasa (*glp*), guanilato kinasa (*gmk*), fosfato acetiltransferasa (*pta*), triosafosfato isomerasa (*tpi*) y acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqiL*)³⁴. Las secuencias obtenidas son comparadas con alelos previamente caracterizados, en la base de datos: *www.mlst.net*. Al realizar la comparación, a las secuencias obtenidas se le asigna un número que indica el alelo que es y cada aislado es definido por la combinación de los 7 alelos, dando el perfil alélico o ST (del inglés *Sequence Type*). Los STs son agrupados en complejos clonales (CC) que muestran, al menos, 5 alelos en común, asumiendo que el ancestro de cada CC es aquel cuyo genotipo tenga el mayor número de variantes en un único *locus*. Estos resultados pueden ser presentados mediante BURST (del inglés *Based Upon Related Sequence Types*), que ha sido introducido para la tipificación de bacterias con estructura de población epidémica³⁵. Las variantes en un único locus o SLV (del inglés *Single-Locus Variants*) son representadas en un círculo alrededor del ancestro, las variantes en dos *loci* o DLV (del inglés *Double-Locus Variants*) se representan en un segundo círculo por fuera del primero y las variantes en tres *loci* o TLV (del inglés *Triple-Locus Variants*) en un tercer círculo (Figura 1. 3A). Esta interpretación ha evolucionado en los últimos tiempos (eBURST), presentándose por líneas las relaciones entre los distintos STs (Figura 1. 3B). Este programa ha sido utilizado satisfactoriamente en estudios de historia evolutiva de SARM³⁶.

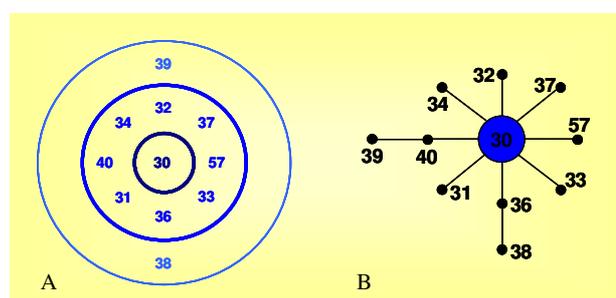


Figura 1. 3. Representación del CC30, mediante el empleo del programa informático BURST (A) y de su versión mejorada eBURST (B). Ambas muestran el ancestro común, los ST que son SLV y DLV de él.

6. Caracterización del casete cromosómico estafilococal *mec* (SCC*mec*): Estudios epidemiológicos de SARM y de sus relaciones evolutivas han mostrado que,

además del análisis del genoma central, es necesaria la identificación del tipo de SCC*mec*. Dicha identificación está basada en una PCR múltiple, por lo que se considera de tercera generación, aunque su resultado se utiliza en combinación con los datos del MLST, que, como se dijo previamente, es una técnica de cuarta generación. El SCC*mec* es un elemento genético móvil heterogéneo que se integra de forma específica en la región *orfX* del genoma de *S. aureus*. Sus componentes principales son el complejo *ccr* (del inglés *chromosome cassette recombinase*), responsable de su inserción/escisión, y el complejo *mec*, que contiene el gen de resistencia a la meticilina *mecA* y sus genes reguladores (*mecI* y *mecRI*)³⁷. Las restantes zonas del casete son las denominadas regiones J (J1-J3), que constituyen regiones no esenciales del elemento, pero pueden aportar otros genes de resistencia a antibióticos, transposones (Tn4001 y/o Tn554) y/o plásmidos (pUB110 y pT181). La organización estructural del SCC*mec* se puede representar de forma resumida como J1-*ccr*-J2-*mec*-J3. Las combinaciones de los distintos tipos de *ccr* y del complejo *mec* distinguen los tipos de SCC*mec*, mientras que las variaciones en las regiones J dentro de la misma combinación *ccr-mec* son usadas para definir los subtipos (Figura 1. 4)³⁷⁻⁴¹. Hasta el momento, se han descrito ocho estructuras principales de SCC*mec* (I-VIII) para SARM, aunque cada vez se van describiendo nuevos casetes y nuevas variantes de ellos⁴². Además, estas estructuras se pueden agrupar en tres clases diferentes: la clase A que contiene completo el complejo regulador *mecI-mecRI-mecA*, y las clases B y C que presentan interrumpida la estructura reguladora por la integración de secuencias de inserción (IS431 e IS1272)⁴³.

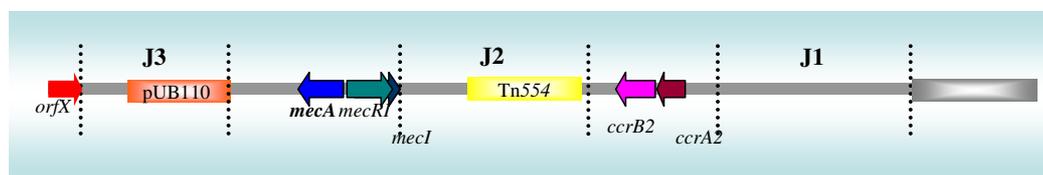


Figura 1. 4. Esquema que representa la estructura general que compone los distintos tipos de SCC*mec*.

Se han descrito varias estrategias de PCR múltiple para la determinación del tipo de SCC*mec*. Dos de los métodos más extendidos son el método de Oliveira *et al.*, que nos permite diferenciar los casetes del I-IV⁴⁴, y su actualización, mediante la cual podemos diferenciar, además, los casetes IV, V y VI⁴⁵, los más frecuentes.

1.1.3. Elección del método adecuado

En los últimos años, se han realizado estudios en los que se han comparado diferentes métodos para la caracterización de los SARM. El fin de estos estudios es encontrar el método ideal para el análisis de una población microbiana de este patógeno. Para evaluar cuál es el mejor método se debe atender a dos aspectos: el criterio de la conveniencia, que hace referencia a la eficiencia del método; y el criterio del rendimiento, que hace referencia a la eficacia del método⁴⁶. La conveniencia, y por tanto la eficiencia, se evalúa mediante la rapidez, el coste y la facilidad para la ejecución e interpretación del método, mientras que la eficacia del método se mide a través de:

- 1) Tipificabilidad o capacidad de tipificación: Porcentaje de cepas bacterianas que pueden ser asignadas a un marcador mediante un método.
- 2) Reproducibilidad: Porcentaje de cepas que dan el mismo resultado cada vez que se repite el método.
- 3) Poder de discriminación: Habilidad del método para distinguir aislados no relacionados. Se determina por el número de tipos identificados y por las frecuencias relativas de dichos tipos. Estos dos aspectos no pueden ser definidos por un único valor, por lo que no los podemos usar para comparar métodos. Por este motivo se aplica el Índice de Diversidad de Simpson (D), que mide la probabilidad de que dos cepas relacionadas sean colocadas en distintos grupos de tipificación⁴⁷. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$D = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde N es el número de aislados totales, S es el número total de tipos descritos y n_j es el número de aislados pertenecientes al tipo j . Un nivel de discriminación aceptable va a depender del método, pero es recomendable un método con un índice de discriminación superior a 0,90. Este índice se puede aplicar a diferentes técnicas y en función de su valor, deducir cuál tiene mayor poder de discriminación. El Índice de Diversidad de Simpson es una estimación imparcial de la verdadera diversidad (λ) de una población basada en una muestra (n) de individuos. Por lo tanto, los valores de D van a variar en función de las muestras recogidas, y esta variabilidad de nuestros

datos en base a la variabilidad verdadera, se calcula empleando la varianza (δ^2):

$$\delta^2 = \frac{4}{n} \left[\sum \pi_j^3 - (\sum \pi_j^2)^2 \right] \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde n es el número de aislados totales, n_j es el número de aislados pertenecientes el tipo j , y π es la frecuencia resultante de dividir n_j entre n . Se sugiere que la desviación típica (δ) se comporta como una medida de la dispersión que existe de D sobre λ . De ese modo, se establece que dos veces δ en cada lado del valor D , incluiría el 95% de toda la distribución esperada, y es por tanto, una medida aproximada de la confianza con la que varios índices de diversidad pueden ser estimados. A este valor se le llama intervalo de confianza (IC):

$$IC = \left[D - 2\sqrt{\delta^2}, D + 2\sqrt{\delta^2} \right] \quad (\text{Ec. 3})$$

Por lo tanto, usar el IC cuando se trabaja con D aumenta la fiabilidad de la comparación de la diversidad genética obtenida en distintos ambientes, así como la habilidad discriminatoria de distintos sistemas de tipificación⁴⁸.

Además de todo lo anterior, el método a emplear también se debe elegir teniendo en cuenta la escala temporal y el ambiente en el que se vaya a realizar el estudio. Así, por ejemplo, el PFGE es el método más usado para estudios locales y de corto espacio temporal, debido a que presenta dificultades en la reproducibilidad y fiabilidad entre laboratorios. Actualmente, los estudios multicéntricos con esta técnica son factibles gracias a la estandarización de las condiciones de electroforesis y al desarrollo de normalización y análisis software. Sin embargo, el MLST tiene la ventaja de que no existen ambigüedades en las secuencias obtenidas, por lo que la comparación entre laboratorios es más factible. Éste se usa complementado con la determinación del *SCCmec*, aplicando una nomenclatura propuesta por Enright *et al.*, y aceptada por la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas en Tokio en 2002, en la que se combina el ST, el fenotipo y el tipo de *SCCmec*. Por ejemplo: ST22-SARM-IV³⁶.

Además de disponer de herramientas para evaluar cada técnica por separado, recientemente, ha sido propuesto un método para calcular la correspondencia entre

varias métodos de forma cuantitativa⁴⁹. Se basa en dos coeficientes que comparan dos tipos de agrupaciones obtenidas de un mismo grupo de aislados. Estos dos métodos son:

1º) Método ajustado de Rand (AR): Es una corrección del coeficiente de Rand⁵⁰, el cual es comúnmente empleado para cuantificar la congruencia de dos métodos de tipificación⁵¹. El índice de Rand representa la proporción de presencia y ausencia de bandas comunes en los dos métodos a comparar:

$$R = \frac{a + d}{a + b + c + d} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, a son los aislados que se encuentran en el mismo grupo con ambos métodos; b aquellos que se encuentran en el mismo grupo en el método 1 pero no en el método 2; c aquellos que se encuentran en el mismo grupo en el método 2 pero no en el método 1; d los aislados que se encuentran en grupos diferentes en ambos métodos.

Una limitación de este método es que cuando comparamos dos divisiones al azar, el índice no alcanza nunca un valor nulo, indicando que no existe congruencia entre métodos. Esta limitación queda solventada en el método ajustado de Rand, en el que se introduce un factor de corrección (n_c ; que corresponde con a y d , si las dos tipificaciones fueran totalmente independientes) el cual permite una mejor evaluación cuantitativa de la congruencia global entre dos divisiones.

$$AR = \frac{a + d - n_c}{a + b + c + d - n_c} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$n_c = \frac{n(n^2 + 1) - (n + 1) \sum n_i^2 - (n + 1) \sum n_j^2 + 2 \sum \sum \frac{n_i^2 n_j^2}{n}}{2(n - 1)} \quad (\text{Ec. 6})$$

2º) Método de Wallace (W): Mejora la comparación entre dos métodos, porque ofrece un valor único que indica la probabilidad de que dos cepas sean clasificadas como el mismo tipo por estos dos métodos. Da un valor de 0 a 1, que cuanto más cercano a la unidad indica que más predecibles son los resultados de un método con el otro, por lo que resultaría redundante emplear los dos⁵². Se trata, por lo tanto, de un índice asimétrico, ya que un método puede

mostrar una determinada capacidad para predecir los resultados obtenidos por otro, y esa capacidad no ser la misma en el sentido contrario.

$$W_1(1,2) = \frac{a}{a+b} \qquad W_2(1,2) = \frac{a}{a+c} \qquad (\text{Ec. 7})$$

Además, ya que el cálculo de la congruencia entre dos métodos depende de la población particular en la que se haga el estudio, existe una determinada variabilidad con respecto a la población real, por lo que el valor W debe ir acompañado de un intervalo de confianza⁵³.

$$IC = W_{A \rightarrow B} \pm 2\sqrt{\delta^2(W_{A \rightarrow B})} \qquad (\text{Ec. 8})$$

Donde $W_{A \rightarrow B}$ queda definido como el ratio del número de parejas de individuos con la misma clasificación según A y B sobre el número de parejas de individuos con la misma clasificación según A.

En definitiva esta combinación de métodos (Rand ajustado + Wallace) mejora la información que se puede obtener, pues dice si dos métodos presentan una alta relación global y, además, si uno de los métodos puede predecir otro y viceversa.

1.1.4. Comparación del MLVA con otros métodos establecidos

El MLVA es una técnica que fue descrita por primera vez en el año 1997 para tipificar la bacteria *Haemophilus influenzae*⁵⁴. Como previamente se ha visto, consiste en la amplificación simultánea de regiones repetidas en tándem en número variable o VNTR (del inglés *Variable-Number Tandem Repeat*) de varios *loci*. Las regiones repetidas en tándem son zonas del genoma susceptibles de error por parte de la ADN polimerasa debido a un fenómeno denominado deslizamiento de hebra o *Slipped Strand Mispairing* (SSM)⁵⁵. Si bien la frecuencia de variación es relativa a los sistemas de reparación del ADN de la bacteria, en general, es frecuente encontrar variaciones en el número de estas repeticiones por este fenómeno, dando lugar a alelos más cortos o más largos, que serán transmitidos a sucesivas generaciones. Por lo tanto, la base del MLVA

radica en la rapidez con la que evolucionan las secuencias VNTRs, junto con la resolución que ofrece el análisis simultáneo de estas secuencias en varios *loci*.

Posteriormente, el MLVA fue adaptado para tipificar cepas de *Bacillus anthracis*⁵⁶. En este caso, su aplicación fue particularmente notable debido a que se trata de una especie de especial relevancia que presenta una gran homogeneidad genética. A partir de entonces, este método fue puesto a punto para distintas especies bacterianas, tomando un papel importante en la caracterización de cepas susceptibles de ser usadas en bioterrorismo, como *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis*⁵⁷⁻⁵⁹.

En 2003, el MLVA fue adaptado por primera vez para *S. aureus*²⁸. El genoma de esta bacteria posee varios *loci* con este tipo de repeticiones, entre los que se encuentran los elegidos por Sabat *et al.* para la realización de esta técnica. Estos *loci* son *clfA*, *clfB*, *sdr*, *ssp* y *spa*, y, como se ha visto, codifican proteínas implicadas en la virulencia de las cepas. El *locus sdr* incluye 3 genes: *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*⁶⁰, que codifican para las 3 proteínas Sdr C, D y E. Éstas, junto con los factores de aglutinación A y B (o proteínas de unión al fibrinógeno A y B) codificados por los genes *clfA* y *clfB*^{61,62}, respectivamente, pertenecen a la familia de proteínas conocida como MSCRAMM (del inglés *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Las proteínas de esta familia se caracterizan por la presencia de una región R que contiene varias repeticiones de 18 nucleótidos, los cuales codifican repeticiones de dipéptidos de serina-aspartato (SD), localizados en un fragmento de ADN situado en el extremo 3', quedando el extremo carboxilo implicado en el anclaje a la pared celular⁶³ (Figura 1. 5). El *locus ssp* contiene el gen *sspA*, que codifica para la serinoproteasa V8⁶⁴, una proteína extracelular cuyo extremo carboxilo terminal se construye por múltiples repeticiones de tripéptidos prolina-aspartato-aspartato (PDD)⁶⁵. Y finalmente, el gen *spa* codifica la proteína A, proteína de superficie que presenta repeticiones de 18 pb codificando prolinas (P)⁶⁶.

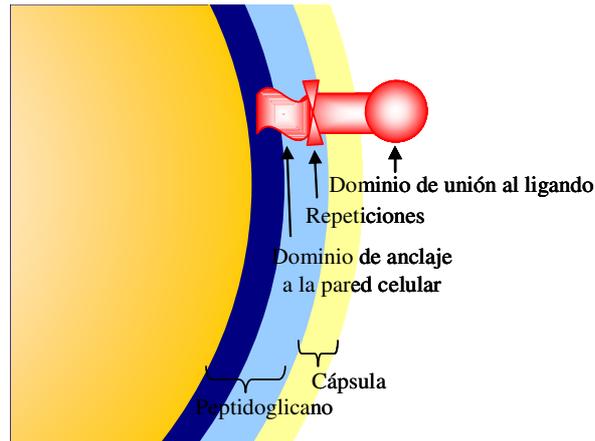


Figura 1. 5. Visión del recubrimiento de *S. aureus*, propio de una bacteria Gram positiva, en el cual se aprecian las partes de las que constan los factores de aglutinación, tanto A como B.

Debido a la sencillez de este método, diferentes autores han intentado, mediante comparación de sus resultados con los obtenidos por otras técnicas, analizar su utilidad en la tipificación clínica de *S. aureus*. Puesto que los métodos de tipificación más extendidos en la comunidad científica son el PFGE y el MLST, los principales estudios realizados han comparado los resultados de ambas técnicas con los ofrecidos por el MLVA⁶⁷⁻⁷¹. Además, debido a que el MLVA es una técnica nueva, aún no hay un criterio internacionalmente aceptado sobre el grado de similitud que deben mostrar dos aislados para considerarse pertenecientes al mismo clon. En un principio, Sabat *et al.* propusieron que una única banda de diferencia en el patrón del MLVA era suficiente para distinguir clones²⁸. No obstante, estudios posteriores se han centrado en la búsqueda de ese punto de corte que hace que se correlacionen mejor los datos con las otras técnicas citadas anteriormente. Tenover *et al.* ensayaron dos puntos de corte para el MLVA, similitud $\geq 75\%$ y $\geq 80\%$, y observaron que tanto con un criterio como con el otro, era posible diferenciar cepas con idéntico PFGE mediante MLVA, hecho que también observaron Moser *et al.*⁶⁹. Además, sus resultados indican que aplicar el punto de corte de $\geq 75\%$ ayudaría a identificar brotes de una cepa dentro de un hospital en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, para la colección de aislados recogidos en dicho estudio, el MLVA no fue capaz de reproducir los grupos obtenidos por PFGE⁶⁸. Malachowa *et al.* observaron una correlación entre los datos obtenidos por MLVA aplicando un punto de corte de similitud $\geq 70\%$ con los del PFGE, pero variando el punto de corte de este método al 75%. Una de las conclusiones más interesantes de este estudio es que el nivel de correlación entre distintos métodos de tipificación puede

variar y depende de la colección de aislados en la que se realice el estudio⁶⁷. Ésta es la explicación de que, entre todos los estudios publicados hasta el momento sobre el tema, no exista un consenso sobre qué punto de corte aplicar al MLVA, y sobre si puede o no sustituir al PFGE o el MLST como técnica de tipificación.

1.2. OBJETIVOS

Conociendo todo lo anterior, los objetivos planteados en esta parte del trabajo han sido:

1. Decidir qué punto de corte de similitud resulta más conveniente aplicar en el MLVA para establecer relaciones clonales, que correlacionen con los datos previamente obtenidos mediante la combinación de los métodos PFGE/MLST-SCC*mec*.

2. Obtener conclusiones propias sobre la utilidad del MLVA a nivel clínico, comprobando si esta técnica puede establecerse como control de rutina en el Servicio de Microbiología Clínica del HUNSC.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Aislados clínicos y período de estudio

Para la validación del MLVA como técnica de rutina en el hospital, se empleó una colección bien caracterizada de aislados de SARM adquiridos en el hospital (SARM-AH)⁷². Se consideraron hospitalarios, los aislados de SARM que fueron obtenidos a partir de muestras de pacientes hospitalizados en el HUNSC después de 72 horas de su ingreso. Los aislados fueron recogidos e identificados por el Servicio de Microbiología del hospital desde enero de 1998 hasta diciembre de 2002. En total se obtuvieron 375 SARM-AH, de los cuales 292 fueron recuperados e incluidos en este estudio⁷³.

1.3.2. Caracterización previa de los SARM-AH

En esta colección de SARM-AH fue determinado el perfil de susceptibilidad en cada uno de los aislados frente a siete antibióticos: penicilina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, teicoplanina y vancomicina. Asimismo, se caracterizaron mediante PFGE, MLST y SCC*mec*. Se observó que los resultados de estas tres últimas técnicas correlacionaban, no así los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. Por lo tanto, los resultados combinados de PFGE, MLST y SCC*mec* fueron utilizados en este estudio, de tal forma que cada aislado quedara caracterizado de la siguiente manera: tipo de PFGE/ST-SCC*mec*, por ejemplo: PFGE B/ST36-SCC*mec*II. Para definir los tipos de PFGE se empleó el punto de corte previamente establecido por Tenover *et al*⁵.

Los aislados que formaron parte del estudio pertenecieron a los principales clones encontrados en el hospital: PFGE-A/ST247-SCC*mec*IA (*n*=58), PFGE-36/ST36-SCC*mec*II (*n*=164), PFGE-C/ST125-SCC*mec*IVA (*n*=50), PFGE-D/ST146-SCC*mec*IVA (*n*=8), y PFGE-E/ST22-SCC*mec*IV (*n*=5). Aunque también fueron incluidos otros aislados pertenecientes a clones, considerados esporádicos pues solo se

encontró un aislado de cada uno ($n=1$): PFGE-M/ST80-SCC*mecIV*, PFGE-O/ST239-SCC*mecIII*, PFGE-F/ST30-SCC*mecIV*, PFGE-U/ST88-SCC*mecIV*, PFGE-D/ST471-SCC*mecIV*, PFGE-V/ST8-SCC*mecIV* y PFGE-L/ST8-SCC*mecIV*A.

1.3.3. Optimización del MLVA

Para la realización del MLVA se partió del artículo previamente publicado por Sabat *et al*²⁸. No obstante, las condiciones de amplificación publicadas en dicho artículo no resultaron adecuadas para llevar a cabo el MLVA en nuestro laboratorio. Por ese motivo, aunque se mantuvieron los cebadores originales, se siguió un proceso de optimización, tanto de las concentraciones de los distintos reactivos como del programa de amplificación (Figura 1. 6). El resultado óptimo se obtuvo bajo las siguientes condiciones: tampón de reacción 1X, 1,5 mM de MgCl₂, dNTP 0,2 mM, 1,2 μM de los cebadores ClfA-F, ClfA-R, ClfB-F, ClfB-R, SdrCDE-F, SdrCDE-R, 1 μM de los cebadores Sspa-F y Sspa-R, 0,5 μM de los cebadores Spa-F y Spa-R y 0,05 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido), en un volumen final de 20 μl.

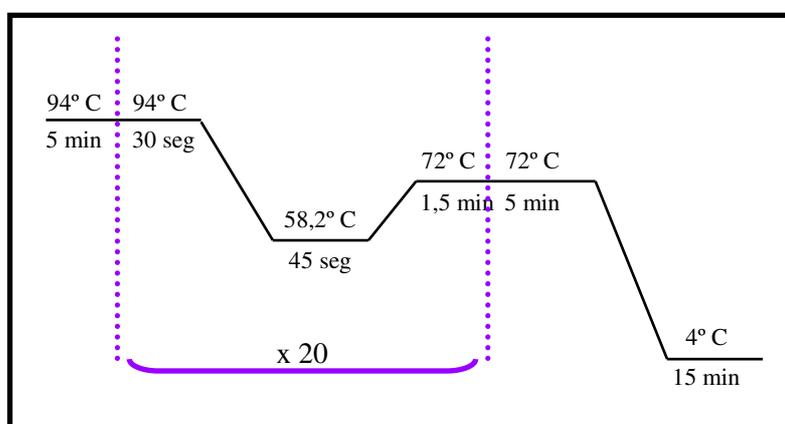


Figura 1. 6 Esquema del programa de amplificación optimizado para el MLVA.

El tampón de carga normalmente empleado en los gels de agarosa lleva en su composición los colorantes azul de bromofenol y xileno cianol. En nuestros experimentos hemos observado que estos colorantes al ser iluminados con luz ultravioleta muestran interferencia con algunas bandas del MLVA (Figura 1. 7). Por este motivo, los productos de PCR del MLVA se cargaron en un gel de agarosa al 2%, mezclados únicamente con glicerol al 30%. El frente de avance del gel se controló con

los carriles correspondientes al marcador XIV (Roche Diagnostics, Suiza), los cuales se cargaron con el tampón de carga completo con los dos colorantes. Los geles se visualizaron y se fotografiaron bajo luz ultravioleta, tras su tinción con bromuro de etidio, empleando el sistema GelDoc 2000 (Bio-rad, Estados Unidos).

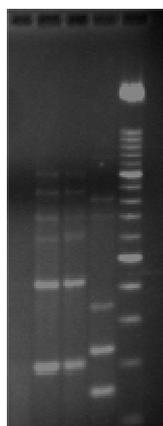


Figura 1. 7. Interferencia que presenta el colorante xileno cianol con las bandas de mayor tamaño.

Para ensayar la reproducibilidad del método se eligieron 10 aislados al azar repartidos entre tipos distintos de MLVA, a los cuales se les realizó la técnica en tres experimentos independientes.

1.3.4. Análisis de los patrones de MLVA

Las imágenes obtenidas con los patrones de MLVA fueron exportadas en formato TIFF para su análisis con el programa informático *InfoQuest* (Bio-rad, Estados Unidos). Dicho programa asigna automáticamente los carriles y las bandas, que, posteriormente, fueron revisados y corregidos manualmente cuando fue necesario. Para el cálculo de la similitud entre cada par de aislados del estudio se empleó el coeficiente de Dice (S_D), que compara la presencia o ausencia de cada banda en cada uno de los dos aislados. Este coeficiente es el más utilizado en estos tipos de análisis, y se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$S_D = \frac{2n_{AB}}{2n_{AB} + a + b} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde n_{AB} es el número de bandas presentes en los patrones de los dos aislados que se comparan, a es el número de bandas presentes en el aislado A, pero no en el aislado B, y b es el número de bandas presentes en el aislado B, pero no en el aislado A. La matriz de similitud fue calculada de manera automática por el programa informático. Se empleó el método UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para realizar el agrupamiento en base a los patrones de bandas, aplicando un valor de tolerancia del 1%.

Debido a la controversia existente en cuanto a qué punto de corte se debe emplear para determinar los distintos tipos de MLVA, los patrones obtenidos mediante esta técnica fueron analizados estableciendo tres puntos de corte distintos:

1º) Todos aquellos patrones que presenten al menos una banda distinta corresponderán con distintos tipos de MLVA, coincidiendo con el criterio inicialmente propuesto por Sabat *et al*²⁸.

2º) Todos los patrones que presenten una similitud $\geq 70\%$ serán considerados pertenecientes al mismo tipo de MLVA, y, dentro de cada tipo, patrones con al menos una banda de diferencia corresponderán con los distintos subtipos.

3º) Todos los aislados que presenten patrones con similitud $\geq 80\%$ serán considerados pertenecientes al mismo tipo, y, dentro de cada tipo, diferencias de al menos una banda marcarán los distintos subtipos.

En cada caso, los tipos de MLVA se nombraron mediante letras minúsculas en orden alfabético desde el tipo más numeroso; y en los puntos de corte 2º) y 3º), fue añadido un número arábigo tras la letra para indicar el subtipo, ordenados también a partir del más abundante.

1.3.5. Comparación de los resultados obtenidos mediante MLVA con los datos PFGE/ST-SCC*mec*

Los tipos y/o subtipos obtenidos mediante el MLVA analizado con cada punto de corte fueron comparados con los datos de PFGE/ST-SCC*mec* previamente determinados.

El primer paso en la comparación fue analizar cuantitativamente el poder de discriminación de cada método por separado mediante D , utilizando la fórmula expresada en la ecuación 1⁴⁶. Este índice fue propuesto por Hunter y Gaston para trabajar con patrones de bandas, ya que no tiene en cuenta la concordancia de ambos patrones en las bandas ausentes, puesto que eso alteraría de forma irreal los resultados⁷⁴. Además, para cada valor de D se estimaron los correspondientes intervalos de confianza, para incrementar la fiabilidad de la capacidad de discriminación de cada sistema⁴⁷.

A continuación, para el análisis de la congruencia entre ambos métodos se emplearon los dos coeficientes propuestos por Carriço *et al.* y explicados previamente: el coeficiente ajustado de Rand (AR) y el de Wallace (W)⁴⁹, añadiendo en este último el cálculo del IC correspondiente⁵³. El cálculo de ambos se realizó de manera automática, empleando la herramienta <http://darwin.phylviz.net/ComparingPartitions/>.

1.4. RESULTADOS

Todos los aislados pudieron ser tipificados satisfactoriamente por MLVA. Las reacciones de amplificación con las 5 parejas de cebadores pudieron ser realizadas bajo las mismas condiciones, en el mismo tubo de reacción. Además, las reacciones de PCR ofrecieron un resultado óptimo tomando como molde las suspensiones celulares, sin haber realizado protocolo de extracción de ADN previo. La reproducibilidad de los resultados del MLVA fue del 100%.

1.4.1. Punto de corte con una banda de diferencia

Aplicando el punto de corte previamente establecido por Sabat *et al.*, donde una única banda de diferencia es suficiente para distinguir tipos distintos de MLVA²⁸, éste dio lugar a 35 patrones diferentes, mostrando un $D = 71,73\%$ (64.07-76.52%). El PFGE presentó un $D = 68.47\%$ (64.07-72.88%), pero, si observamos los intervalos de confianza, la diferencia no es significativa.

Los aislados fueron agrupados según el MLVA en 14 tipos (a-n), y 21 aislados presentaron un patrón de bandas único (ñ-ah). Los clones PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II, PFGE-C/ST125-IVA y PFGE-D/ST146-IVA quedaron divididos según el MLVA en diferentes tipos. Todos los aislados pertenecientes al clon PFGE-E/ST22-IV fueron agrupados juntos, y todos los clones esporádicos, que son PFGE-M/ST80-SCC*mecIV*, PFGE-O/ST239-SCC*mecIII*, PFGE-F/ST30-SCC*mecIV*, PFGE-U/ST88-SCC*mecIV*, PFGE-D/ST471-SCC*mecIV*, PFGE-V/ST8-SCC*mecIV* y PFGE-L/ST8-SCC*mecIVA*, correspondieron con tipos de MLVA únicos. Por lo tanto, con este criterio podemos descartar relaciones entre los aislados, pero no establecerlas.

El análisis cuantitativo mostró bajos valores de congruencia, y más bajos aún cuando los subtipos de PFGE fueron considerados (Tabla 1. 1).

Tabla 1. 1. Correlación del MLVA, analizado bajo los tres puntos de corte del estudio, con el PFGE-MLST-SCC_{mec} según los datos del índice ajustado de Rand y el índice de Wallace. Los recuadros en rojo indican los mejores datos obtenidos.

	MLVA (one band)		MLVA (80%)		MLVA (70%)	
	AR	W (%)	AR	W (%)	AR	W (%)
Tipo PFGE-ST-SCC _{mec}	0.794	98.71 (97.93-99.45)	0.976	98.29 (97.11-99.33)	0.967	96.08 (93.35-98.08)
Subtipo PFGE-ST-SCC _{mec}	0.644	69.21 (61.01-77.38)	0.696	65.86 (58.51-73.12)	0.688	64.62 (57.15-71.59)
Tipo PFGE-ST-SCC _{mec} -CC	0.794	98.71 (97.93-99.45)	0.976	98.29 (97.11-99.33)	0.967	96.08 (93.35-98.08)
Subtipo PFGE-ST-SCC _{mec} -CC	0.644	69.21 (61.01-77.38)	0.696	65.86 (58.51-73.12)	0.688	64.62 (57.15-71.59)
CC	0.765	100	0.957	100	0.986	100

1.4.2. Punto de corte de similitud $\geq 80\%$

Al aplicar al dendrograma el punto de corte del 80%, el número de tipos de MLVA fue reducido de 35 a 17, reduciendo con ello también el poder de discriminación, quedando $D = 61.82\%$ (57.00-66.04%). Estos 17 tipos de MLVA incluyeron 5 grupos de más de un organismo (a-e) y 12 patrones de bandas únicos (f-p) (Anexo 1. 8. 1). Los clones PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II y PFGE-E/ST22-IV correspondieron con los tipos de MLVA b, a y e, respectivamente. Por lo tanto, con este criterio agrupamos satisfactoriamente los aislados que pertenecen al mismo clon, aunque las distribuciones de los subtipos de MLVA y de PFGE no correspondieron. El subtipo de PFGE A1, también llamado clon Ibérico, mostró el mismo patrón de MLVA que los demás subtipos dentro de ese grupo A (A2-A13) (Figura 1. 8A). Ocurrió lo mismo con los subtipos B1 (Figura 1. 8B) y E1, los denominados clones epidémicos SARM-16 y SARM-15, respectivamente.

El análisis cuantitativo introduciendo los datos relativos a los subtipos de PFGE mostró que la congruencia no era la adecuada, AR = 0.696 y W = 65.86 (58.51–73.12). Sin embargo, cuando en la comparación nos centramos en los tipos de PFGE, ambos métodos presentan una buena correlación, AR = 0.976 y W = 98.29 (97.11–99.33) (Tabla 1. 1). A pesar de esta buena correlación, los clones PFGE-C/ST125-IVA

y PFGE-D/ST146-IVA, ambos pertenecientes al CC5, no pudieron ser diferenciados empleando el MLVA, ya que en ambos clones observamos mezcla de los tipos de MLVA c y d (Anexo 1. 8. 1).

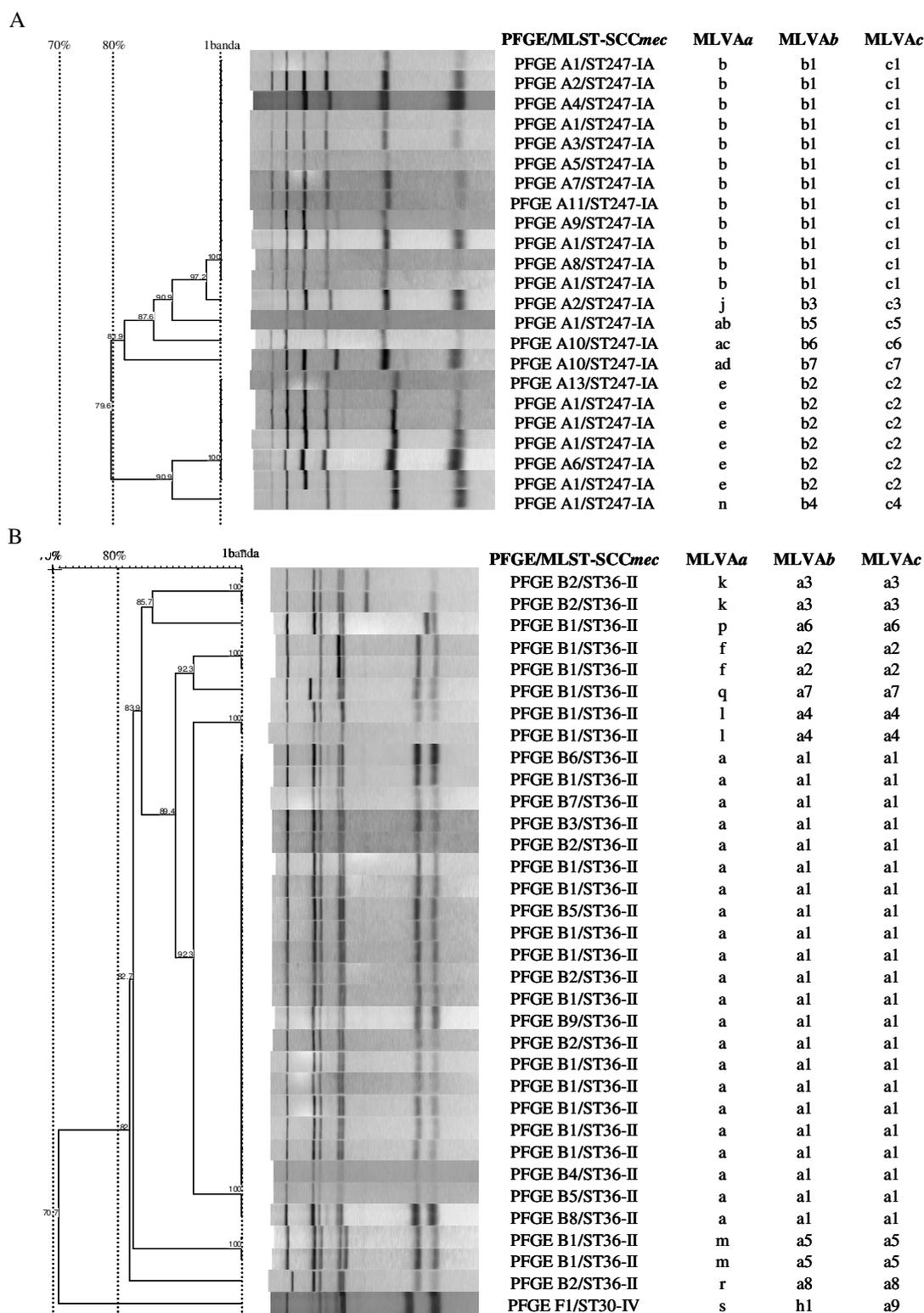


Figura 1. 8. A. Clasificación del clon Ibérico, PFGE A1/ST247-IA y **B.** del clon epidémico EMRSA16, PFGE A1/ST36-II, según el MLVA analizado bajo los tres puntos de cortes distintos empleados en este trabajo ($a=1$ banda, $b=80\%$ y $c=70\%$), así como su relación con otros subtipos del mismo grupo.

1.4.3. Punto de corte de similitud $\geq 70\%$

Aplicando el criterio del punto de corte de similitud $\geq 70\%$, volvemos a reducir el número de tipos de MLVA de 17 a 11, mostrando un $D = 60.48\%$ (55.92-65.04%). Los 11 tipos de MLVA incluyeron 5 grupos de más de 1 organismo (a-e) y 6 patrones de bandas únicos (f-k) (Anexo 1. 8. 1). Como ocurría con el punto de corte del 80%, los clones PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II y PFGE-E/ST22-IV se agruparon también de forma independiente en tres tipos de MLVA. Sin embargo, debido al uso de este criterio menos restringente, el único aislado perteneciente al clon PFGE-F/ST30-IV fue agrupado junto con los aislados del clon PFGE-B/ST36-II, ambos pertenecientes al CC30 (figura 1. 8B). En este caso también los aislados PFGE-C/ST125-IVA y PFGE-D/ST146-IVA fueron mezclados en los tipos formados por el MLVA, con la excepción de un único aislado PFGE-D/ST146-IVA, el cual fue agrupado con el aislado PFGE-N/ST471-IV, ambos pertenecientes al CC5 (Anexo 1. 8. 1).

En base a esto, el MLVA aplicando este criterio nos permitió agrupar aislados que mostraron distinto tipo de PFGE, siempre que estos aislados pertenecieron a clones recogidos en el mismo complejo clonal, lo que se corrobora con el análisis cuantitativo. En este análisis el MLVA presenta una buena correlación con los datos de PFGE/ST-SCC_{mec} solo o teniendo en cuenta los CCs, AR = 0.967 y W = 96.08 (93.35–98.08), en ambos casos. Sin embargo, la mejor correlación se obtuvo cuando comparamos los resultados del MLVA únicamente con los datos de los CCs, mostrando un AR = 0.986 y W = 100% (Tabla 1. 1).

1.5. DISCUSIÓN

Actualmente, existen numerosos métodos de tipificación para la clasificación de SARM en estudios epidemiológicos. Aunque el PFGE es considerado el método por excelencia para estos estudios, las técnicas basadas en el análisis de bandas son reemplazadas, cada vez más frecuentemente, por aquellas basadas en secuencias de ácidos nucleicos, las cuales son superiores en poder de discriminación, ofrecen datos portátiles y más fiables. No obstante, hoy en día estas técnicas no se encuentran al alcance de los laboratorios de microbiología clínica de la mayoría de los hospitales, debido a la inversión económica que suponen, incluido el HUNSC. Por ese motivo, la validación del MLVA como método rutinario de tipificación de aislados de *S. aureus* en nuestro hospital, supondría un avance en el seguimiento y control de las infecciones producidas por este patógeno.

Para este estudio, se partió de una colección de 292 aislados SARM-AH previamente caracterizados. Los datos obtenidos para estos aislados, correspondientes a las técnicas de PFGE, MLST y SCC*mec*, fueron utilizados de forma combinada, de manera que cada aislado quedó definido según su tipo de PFGE/ST-SCC*mec*. Hasta este momento, se han realizado varios estudios que intentan correlacionar los datos de MLVA con otras técnicas, sin embargo, éste es el primero en el que se intenta correlacionar con los datos combinados de varias técnicas. El MLVA se realizó para los 292 aislados, y se analizó de forma independiente el poder de discriminación de cada método. La congruencia entre MLVA y PFGE/ST-SCC*mec* también fue evaluada, así como la capacidad del MLVA para predecir los resultados obtenidos por la combinación de PFGE/ST-SCC*mec*. No obstante, se debe tener en cuenta que la aplicación del MLVA como rutina clínica, también depende de la facilidad del método, de su rapidez y de su coste.

Una vez puesto a punto, el MLVA resultó ser una técnica viable para su realización en un laboratorio de microbiología clínica, por las características previamente indicadas referentes a su eficiencia. Se ha conseguido optimizar la amplificación de cada uno de los siete genes en un único tubo de PCR. Tenover *et al.* propusieron separar la reacción de PCR realizada con los cebadores del gen *spa* de la de

los otros cuatro cebadores, ya que observaron que la amplificación de este gen consume gran parte de los reactivos, haciendo difícil la obtención de producto del gen *sspA*⁶⁸. Sin embargo, esta separación no fue necesaria en nuestro trabajo, ya que se obtuvo un resultado óptimo empleando las 5 parejas de cebadores en la misma reacción, evitando con ello duplicar el número de tubos de PCR y agilizando el trabajo. Además, coincidiendo con dicho estudio⁶⁸, observamos que al preparar mezcla de reacción de PCR para un número de muestras superior a 15 el resultado empeora notablemente, probablemente debido a la formación de artefactos, como dímeros de cebadores, que pudimos observar en los geles de agarosa (Figura 1. 9).

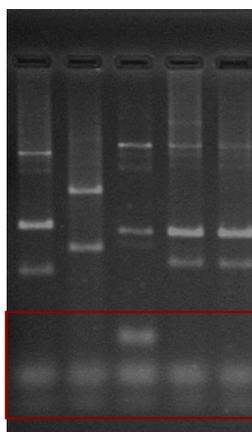


Figura 1. 9. Mal resultado del MLVA debido a la realización de la mezcla de PCR para un número de muestras superior a 15. Recuadrados en rojos se observan los dímeros de cebadores.

El número de bandas obtenido varió entre 7, que son las esperadas, 6, e incluso 5, debido a variaciones en la presencia de los genes *sdrD* y *sdrE*, tal y como ya había sido detectado previamente^{71,75} (figura 1. 10). Sin embargo, los patrones de los aislados escogidos para el ensayo de reproducibilidad se mantuvieron constantes en cada experimento de MLVA, por lo que, tal y como ya habían observado otros autores^{67,68}, la reproducibilidad del método es del 100%.

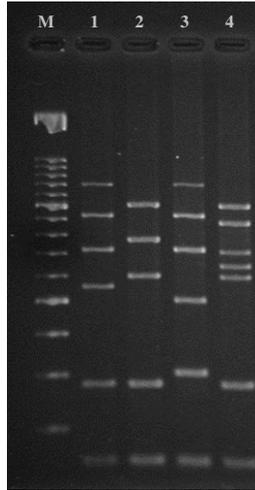


Figura 1. 10. Fragmento de un gel de electroforesis donde se pueden observar distintos patrones de bandas. El carril M muestra el marcador XIV (Roche Diagnostics, Suiza), los carriles 1 y 3 muestran patrones con 6 bandas; el 2 muestra solo 5 bandas; y, finalmente el carril 4 muestra un perfil completo con las 7 bandas del MLVA.

Al igual que Sabat *et al.*, no determinamos el número exacto de repeticiones obtenidas para cada gen²⁸, hecho considerado como una desventaja del método por algunos autores⁷⁶. Sin embargo, creemos que la finalidad de esta técnica se ve satisfecha obteniendo un patrón de bandas característico y reproducible en cada aislado. Para calcular el número exacto de repeticiones habría que secuenciar cada fragmento, lo cual elevaría el coste de la técnica alejándola de su aplicación en clínica. Pero además, presenta otros dos inconvenientes, por un lado, la introducción de errores por parte de la ADN polimerasa debido a las secuencias repetidas, y, por otro lado, las bandas obtenidas en los genes *clfA* y *clfB* superan las 1000 pb, tamaño de fragmento que entraña especial dificultad sin la posibilidad de diseñar un cebador interno a dicho fragmento. Esto le ocurrió a Holmes *et al.* en su estudio, donde encontraron una banda de aproximadamente 2.200 pb que no pudo ser detectada por electroforesis capilar, por poseer un tamaño mayor que el límite de detección del marcador LIZ⁷⁵.

El programa informático *InfoQuest* (Bio-rad, Estados Unidos), similar al Bionumerics (Applied Maths, Bélgica), ha resultado ser una herramienta útil y fácil de usar para el análisis automático de patrones de bandas. No obstante, aunque el *InfoQuest* (Bio-rad, Estados Unidos) facilita dicho análisis, se necesita siempre una inspección visual. Esto es debido a que se ha observado que, pequeñas variaciones normales en los gels de agarosa pueden hacer que dos bandas distintas sean consideradas como iguales por el programa, o viceversa. De ahí, la necesidad del buen

entrenamiento del personal encargado de esta labor, ya que se incluye una subjetividad que puede restar utilidad y fiabilidad al método.

1.5.1. Punto de corte con una banda de diferencia

Tomando como punto de corte una única banda de diferencia para distinguir tipos de MLVA²⁸, obtuvimos 35 patrones distintos que correspondieron con 35 tipos de MLVA. Con los índices de Diversidad obtenidos, expresados en el apartado de resultados, se observa que entre las habilidades de ambos métodos para discriminar las cepas de SARM, la diferencia no es significativa, con un 95% de confianza⁷⁷.

Éste es el criterio más restrictivo, y aplicándolo se ha observado que los grupos más numerosos, el PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II, PFGE-C/ST125-IVA y PFGE-D/ST146-IVA, quedaron divididos en varios tipos distintos de MLVA. Tenover *et al.* obtuvieron resultados similares aplicando el mismo criterio, pero intentando determinar si el MLVA podría predecir los tipos USA de PFGE⁶⁸. Estos tipos USA constituyen un sistema de nomenclatura para los resultados de PFGE, que ha sido adoptado nacionalmente en Estados Unidos, consiguiendo que los científicos utilicen una terminología común con la que referirse a ciertas cepas de SARM. Además, estos tipos USA han sido validados mediante MLST y *spa typing*⁷⁸. De esta forma, el MLVA separó la cepa USA300, importante epidemiológicamente por los brotes a los que ha dado lugar, en cuatro grupos distintos, USA100 en nueve tipos, USA200 en cinco, USA500 en dos, USA700 en tres, USA800 en 10 y el clon Ibérico en dos tipos de MLVA. En el estudio, Tenover *et al.*, descartaron este criterio ya que no agrupaba juntas cepas que se sabía que estaban epidemiológicamente relacionadas por PFGE, MLST y *spa typing*, y por ello, pasaron a investigar la correlación aplicando puntos de corte de similitud $\geq 80\%$ y $\geq 75\%$.

En el caso objeto de este estudio, se observan resultados análogos, concluyendo que con este criterio es posible establecer relaciones genéticas, pero no descartarlas; es decir, se sabe que aquellos aislados agrupados en el mismo tipo de MLVA están genéticamente relacionados, pero, sin embargo, no podemos descartar que también lo estén aislados que aparecen separados en la clasificación. Estas conclusiones se ven apoyadas por los valores de AR y W obtenidos (Tabla 1. 1).

En base a la escasa aplicabilidad del MLVA interpretado bajo este criterio, se ha investigado la correlación entre ambos métodos empleando otros puntos de corte. Debido a que no existe criterio establecido de forma justificada, tal y como ocurre con el PFGE⁵, y ya que diferentes autores han elegido puntos de corte de manera azarosa, se han seleccionado de igual forma los valores de similitud mayores o iguales al 80% y al 70% para definir tipos de MLVA.

1.5.2. Punto de corte de similitud \geq 80%

Al aplicar este punto de corte menos restrictivo, el número de tipos de MLVA fue reducido a 17, disminuyendo así el poder de discriminación de la técnica. No obstante, observando los intervalos de confianza, nuevamente la diferencia entre el *D* obtenido para el MLVA y el PFGE/MLST-SCC*mec* no es significativa.

Aplicando este criterio hemos conseguido que los clones mayoritarios, PFGE-A/ST247-IA y PFGE-B/ST36-II, y también PFGE-E/ST22-IV, correspondan con un único tipo de MLVA cada uno: b, a y e, respectivamente. Sin embargo, los clones PFGE-C/ST125-IVA y PFGE-D/ST146-IVA, fueron difíciles de distinguir por MLVA, ya que se presentaron de forma mezclada en los tipos de MLVA c y d. En cualquier caso, la forma en la que quedaron distribuidos los subtipos dentro de cada tipo por ambos métodos fue distinta, lo que queda confirmado con el dato cuantitativo de los índices de AR y W al incluir los subtipos (Tabla 1. 1). Por lo tanto, este criterio permite utilizar el MLVA para predecir los tipos de PFGE/MLST-SCC*mec*, pero con él no se puede identificar los posibles brotes de subtipos de PFGE particulares, siendo este hecho sobre todo importante en la detección de clones epidémicos, como el Ibérico, el EMRSA-16 y el EMRSA-15, presentes en nuestro hospital. Malachowa *et al.*, en cambio, obtuvieron buenos resultados de correlación a nivel de subtipos entre el MLVA y el PFGE en su estudio⁶⁷.

Estas diferencias de correlación entre distintos clones de SARM también fueron observadas por Tenover *et al.*, aplicando los puntos de corte del 80% y del 75% con los tipos de PFGE de las cepas USA. Por ejemplo, los aislados USA100 fueron agrupados juntos en el mismo tipo de MLVA, mientras que aislados USA800 fueron separados en 6 diferentes tipos de MLVA. En base a estos resultados, estos autores

propusieron que la variabilidad de los patrones de MLVA debe ser cepa-dependiente⁶⁸. Aún con eso, los niveles de congruencia en nuestro estudio aplicando este criterio son muy altos, lo que lleva a pensar que el MLVA podría ser una herramienta útil para localizar y seguir la circulación de estas cepas SARM dentro del hospital. Sin duda, ésto ayudaría a reducir el número de infecciones nosocomiales, tal y como ha sido propuesto^{16,18}.

1.5.3. Punto de corte de similitud $\geq 70\%$

Nuevamente, al disminuir la restricción del valor del punto de corte de similitud, el número de tipos y con él, el poder de discriminación de la técnica, se ven reducidos; aunque continua siendo no significativa la diferencia entre éste y el *D* de PFGE/MLST-SCC*mec*. Este punto de corte clasificó los aislados SARM-AH en 5 grupos (a-e), pertenecientes a los CC principales, y 6 patrones únicos (f-k). De la misma forma que ocurría con el criterio anterior, con este criterio los clones PFGE-A/ST247-IA y PFGE-B/ST36-II, PFGE-E/ST22-IV, correspondieron con un único tipo de MLVA cada uno; b, a y e, respectivamente. Sin embargo, al emplear este criterio menos restringente, el PFGE-F/ST30-IV quedó agrupado junto con el grupo del clon PFGE-B/ST36-II, ambos pertenecientes al CC30 (Figura 1. 7B). A su vez, los clones PFGE-C/ST125-IVA y PFGE-D/ST146-IVA, volvieron a aparecer mezclados, excepto un aislado PFGE-D/ST146-IVA que quedó agrupado al aislado PFGE-N/ST471-IV, ambos pertenecientes al CC5. Por lo que se observa visualmente que, aplicando este punto de corte, el MLVA tiende a agrupar clones pertenecientes al mismo CC.

Malachowa *et al.* determinaron una buena correlación entre los datos ofrecidos por el MLVA y por el PFGE aplicando un punto de corte del 70% de similitud para el MLVA, pero cambiando el empleado en el análisis del PFGE a un 75%⁶⁷. Sin embargo, no parece conveniente cambiar el punto de corte del 80% para el PFGE, ya que se trata de un criterio justificado e internacionalmente aceptado⁵. En su estudio, Malachowa *et al.* encontraron que el MLVA interpretado con el punto de corte del 70% agrupó aislados con el mismo CC, aunque con algunas excepciones. En este trabajo, sin variar el criterio de análisis para el PFGE, se observó lo mismo, lo que se comprobó mediante los valores de AR y W, que han sido algo más bajos con este criterio, y, sin embargo,

presentan los mejores resultados al comparar el MLVA únicamente con el CC (Tabla 1. 1). En el caso objeto de estudio, la excepción fue el CC8, donde las diferentes cepas pertenecientes a ese complejo, PFGE-A/ST247-IA, PFGE-L/ST8-SCC*mec*IVA, PFGE-O/ST239-SCC*mec*III y PFGE-V/ST8-SCC*mec*IV, no fueron agrupadas juntas. Si bien es verdad, que a pesar de ser un CC con pocos representantes, es el más diverso, ya que todos estos aislados mostraron diferencia en al menos dos de las técnicas incluidas: PFGE, MLST y SCC*mec*, mientras que los demás CC, aunque más numerosos, son más homogéneos.

1.6. CONCLUSIONES

Una vez realizadas las comparaciones entre el MLVA y las técnicas PFGE/MLST-SCC*mec*, aplicando distintos puntos de corte para el primero es posible extraer las siguientes conclusiones:

1. El MLVA es una técnica rápida y sencilla, viable en cuanto a la eficiencia para su realización rutinaria en un laboratorio de microbiología clínica.
2. EL MLVA es una técnica fiable en cuanto a su nivel de reproducibilidad.
3. El MLVA, aplicando un punto de corte de similitud $\geq 80\%$ para establecer relaciones entre los distintos aislados SARM-AH, ha resultado ser una herramienta útil para realizar un seguimiento de las distintas cepas que se encuentran circulando en el HUNSC.
4. Aplicando un punto de corte de similitud $\geq 70\%$ para establecer relaciones entre los distintos aislados SARM-AH, es posible establecer grupos de aislados pertenecientes al mismo CC.

1.7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Rosenthal, V.D., D.G. Maki, A. Mehta, C. Alvarez-Moreno, H. Leblebicioglu, F. Higuera, L.E. Cuellar, N. Madani, Z. Mitrev, L. Dueñas, J.A. Navoa-Ng, H.G. Garcell, L. Raka, R.F. Hidalgo, E.A. Medeiros, S.S. Kanj, S. Abubakar, P. Nercelles, R.D. Pratesi; International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) members.** 2008. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. *Am. J. Infect. Control.* **36:** 627-637.
2. **Rosenthal, V.D., H. Bijie, D.G. Maki, Y. Mehta, A. Apisarnthanarak, E.A. Medeiros, H. Leblebicioglu, D. Fisher, C. Alvarez-Moreno, I.A. Khader, M. Del Rocío González Martínez, L.E. Cuellar, J.A. Navoa-Ng, R. Abouqal, H.G. Garcell, Z. Mitrev, M.C. Pirez García, A. Hamdi, L. Dueñas, E. Cancel, V. Gurskis, O. Rasslan, A. Ahmed, S.S. Kanj, O.C. Ugalde, T. Mapp, L. Raka, C.Y. Meng, L.T. Thu, S. Ghazal, A. Gikas, L.P. Narváez, N. Mejía, N. Hadjieva, M.O. Gamar Elanbya, M.E. Guzmán Siritt, K. Jayatilleke; INICC members.** 2011. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am. J. Infect. Control.* [Epub ahead of print]
3. **Orskov, F., I. Orskov.** 1983. From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. *J. Infect. Dis.* **148:** 346-357.
4. **van Belkum, A., M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh, M. Tibayrenc.** 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **14:** 547-560.
5. **Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33:** 2233-2239.
6. **Cluff, L.E., R.C. Reynolds, D.L. Page, J.L. Breckenridge.** 1968. Staphylococcal bacteremia and altered host resistance. *Ann. Intern. Med.* **69:** 859-873.

7. **Wakefield, D.S., M.A. Pfaller, G.T. Hammons, R.M. Massanari.** 1987. Use of the appropriateness evaluation protocol for estimating the incremental costs associated with nosocomial infections. *Med. Care.* **25:** 481-488.
8. **Wakefield, D.S., C.M. Helms, R.M. Massanari, M. Mori, M. Pfaller.** 1988. Cost of nosocomial infection: relative contributions of laboratory, antibiotic, and per diem costs in serious *Staphylococcus aureus* infections. *Am. J. Infect. Control.* **16:** 185-192.
9. **Abramson, M.A., D.J. Sexton.** 1999. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: at what costs? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20:** 408-411.
10. **Whitby, M., M.L. McLaws, G. Berry.** 2001. Risk of death from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Med. J. Aust.* **175:** 264-267.
11. **Cosgrove, S.E., Y. Qi, K.S. Kaye, S. Harbarth, A.W. Karchmer, Y. Carmeli.** 2005. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26:** 166-174.
12. **Gould, I.M.** 2006. Costs of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **28:** 379-384.
13. **Cosgrove, S.E., G. Sakoulas, E.N. Perencevich, M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y. Carmeli.** 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **36:** 53-59.
14. **Lucet, J.C., X. Paoletti, I. Lolom, C. Paugam-Burtz, J.L. Trouillet, J.F. Timsit, C. Deblangy, A. Andremont, B. Regnier.** 2005. Successful long-term program for controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units. *Intensive Care Med.* **31:** 1051-1057.
15. **Clancy, M., A. Graepler, M. Wilson, I. Douglas, J. Johnson, C.S. Price.** 2006. Active screening in high-risk units is an effective and cost-avoidant method to reduce the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in the hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27:** 1009-1017.

16. **Huang, S.S., D.S. Yokoe, V.L. Hinrichsen, L.S. Spurchise, R. Datta, I. Miroshnik, R. Platt.** 2006. Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **43**: 971-978.
17. **van Trijp, M.J., D.C. Melles, W.D. Hendriks, G.A. Parlevliet, M. Gommans, A. Ott.** 2007. Successful control of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in a large teaching hospital in the Netherlands. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**: 970-975.
18. **Chaberny, I.F., F. Schwab, S. Ziesing, S. Suerbaum, P. Gastmeier.** 2008. Impact of routine surgical ward and intensive care unit admission surveillance cultures on hospital-wide nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a university hospital: an interrupted time-series analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 1422-1429.
19. **Fleurette, J., A. Modjadedy.** 1968. Critical study of the principal characteristics of pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. The use of serotyping as means of comparison. *Pathol. Microbiol.* **32**: 191-204.
20. **Fisk, R.T.** 1942. Studies on staphylococci: I. Occurrence of bacteriophage carriers among strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **71**: 153-160.
21. **Rountree, P.M.** 1949. The serological differentiation of staphylococcal bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* **3**: 164-173.
22. **Williams, R.E., J.E. Rippon.** 1952. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Hyg.* **50**: 320-353.
23. **Hood, A.M.** 1953. Phage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Hyg.* **51**: 1-15.
24. **Elek, S.D., C. Moryson.** 1974. Resistotyping of *Staphylococcus aureus*. *J. Medical Microbiol.* **7**: 237-249.
25. **Goering, R.V.** 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* **10**: 866-875.
26. **Goering, R.V., E.A. Ruff.** 1993. Comparative analysis of conjugative plasmids mediating gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**: 450-452.

27. Chung, M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. Aires de Sousa, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sá-Leão, I. Santos Sanches, J.H. Song, P.T. Tassios, P. Villari. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**: 189-198.
28. Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, J. Potempa. 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**: 1801-1804.
29. Frenay, H.M., A.E. Bunschoten, L.M. Schouls, W.J. van Leeuwen, C.M. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, F.R. Mooi. 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.
30. Guss, B., M. Uhlen, B. Nilsson, M. Lindberg, J. Sjoquist, J. Sjodahl. 1984. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur. J. Biochem.* **138**: 413-420.
31. Schneewind, O., P. Model, V.A. Fischetti. 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell.* **70**: 267-281.
32. von Heijne, G., M. Uhlen. 1987. Homology to region X from staphylococcal protein A is not unique to cell surface proteins. *J. Theor. Biol.* **127**: 373-376.
33. Aires-de-Sousa, M., K. Boye, H. de Lencastre, A. Deplano, M.C. Enright, J. Etienne, A. Friedrich, D. Harmsen, A. Holmes, X.W. Huijsdens, A.M. Kearns, A. Mellmann, H. Meugnier, J.K. Rasheed, E. Spalburg, B. Strommenger, M.J. Struelens, F.C. Tenover, J. Thomas, U. Vogel, H. Westh, J. Xu, W. Witte. 2006. High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 619-621.
34. Enright, M.C., N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock, B.G. Spratt. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and

- methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1008-1015.
35. **Feil, E.J., J.E. Cooper, H. Grundmann, D.A. Robinson, M.C. Enright, T. Berendt, S.J. Peacock, J.M. Smith, M. Murphy, B.G. Spratt, C.E. Moore, N.P. Day.** 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* **185**: 3307-3316.
 36. **Enright, M.C., D.A. Robinson, G. Randle, E.J. Feil, H. Grundmann, B.G. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 7687-7692.
 37. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1323-1336.
 38. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* **359**: 1819-1827.
 39. **Ito, T., Y. Katayama, K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1449-1458.
 40. **Oliveira, D.C., A. Tomasz, H. de Lencastre.** 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.* **7**: 349-361.
 41. **Ma, X.X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum, K. Hiramatsu.** 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1147-1152.
 42. **Zhang, K., J.A. McClure, S. Elsayed, J.M. Conly.** 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 531-540.

43. **Okuma, K., K. Iwakawa, J.D. Turnidge, W.B. Grubb, J.M. Bell, F.G. O'Brien, G.W. Coombs, J.W. Pearman, F.C. Tenover, M. Kapi, C. Tiensasitorn, T. Ito, K. Hiramatsu.** 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4289-4294.
44. **Oliveira, D.C., H. de Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2155-2161.
45. **Milheiro, C., D.C. Oliveira, H. de Lencastre.** 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3374–3377.
46. **Trindade, P.A., J.A. McCulloch, G.A. Oliveira, E.M. Mamizuka.** 2003. Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives. *Braz. J. Infect. Dis.* **7**: 32-43.
47. **Simpson, E.H.** 1949. Measurement of species diversity. *Nature.* **163**: 688.
48. **Grundmann, H., S. Hori, G. Tanner.** 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4190-4192.
49. **Carrico, J.A., C. Silva.Costa, J. Melo-Cristino, F.R. Pinto, H. De Lencastre, J.S. Almeida, M. Ramirez.** 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2524-2532.
50. **Rand, W.M.** 1971. Objective criteria for the evaluation of clustering methods. *J. Am. Stat. Assoc.* **66**: 846-850.
51. **Pinto, F.R., J.A. Carrico, M. Ramirez, J.S. Almeida.** 2007. Ranked Adjusted Rand: integrating distance and partition information in a measure of clustering agreement. *BMC Bioinformatics.* **8**: 44.
52. **Wallace, D.L.** 1983. A method for comparing two hierarchical clusterings: comment. *J. Am. Stat. Assoc.* **78**: 569-576.
53. **Pinto, F.R., J. Melo-Cristino, M. Ramirez.** 2008. A confidence interval for the Wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. *PLoS One.* **3**: e3696.

54. **van Belkum, A., S. Scherer, W. van Leeuwen, D. Willemse, L. van Alphen, H. Verbrugh.** 1997. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **65**: 5017-5027.
55. **Torres-Cruz, J., M.W. van der Woude.** 2003. Slipped-strand mispairing can function as a phase variation mechanism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 6990-6994.
56. **Keim, P., L.B. Price, A.M. Klevytska, K.L. Smith, J.M. Schupp, R. Okinaka, P.J. Jackson, M.E. Hugh-Jones.** 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **182**: 2928-2936.
57. **Farlow, J., K.L. Smith, J. Wong, M. Abrams, M. Lytle, P. Keim.** 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3186-3192.
58. **Klevytska, A.M., L.B. Price, J.M. Schupp, P.L. Worsham, J. Wong, P. Keim.** 2001. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3179-3185.
59. **Hoffmaster, A.R., C.C. Fitzgerald, E. Ribot, L.W. Mayer, T. Popovic.** 2002. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 1111-1116.
60. **Josefsson, E., K.W. McCrea, D. Ni Eidhin, D. O'Connell, J. Cox, M. Hook, T.J. Foster.** 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* **144**: 3387-3395.
61. **McDevitt, D., P. Francois, P. Vaudaux, T.J. Foster.** 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **11**: 237-248.
62. **Ni Eidhin, D., S. Perkins, P. Francois, P. Vaudaux, M. Hook, T.J. Foster.** 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **30**: 245-257.
63. **Sabat, A., D.C. Melles, G. Martirosian, H. Grundmann, A. van Belkum, W. Hryniewicz.** 2006. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr*

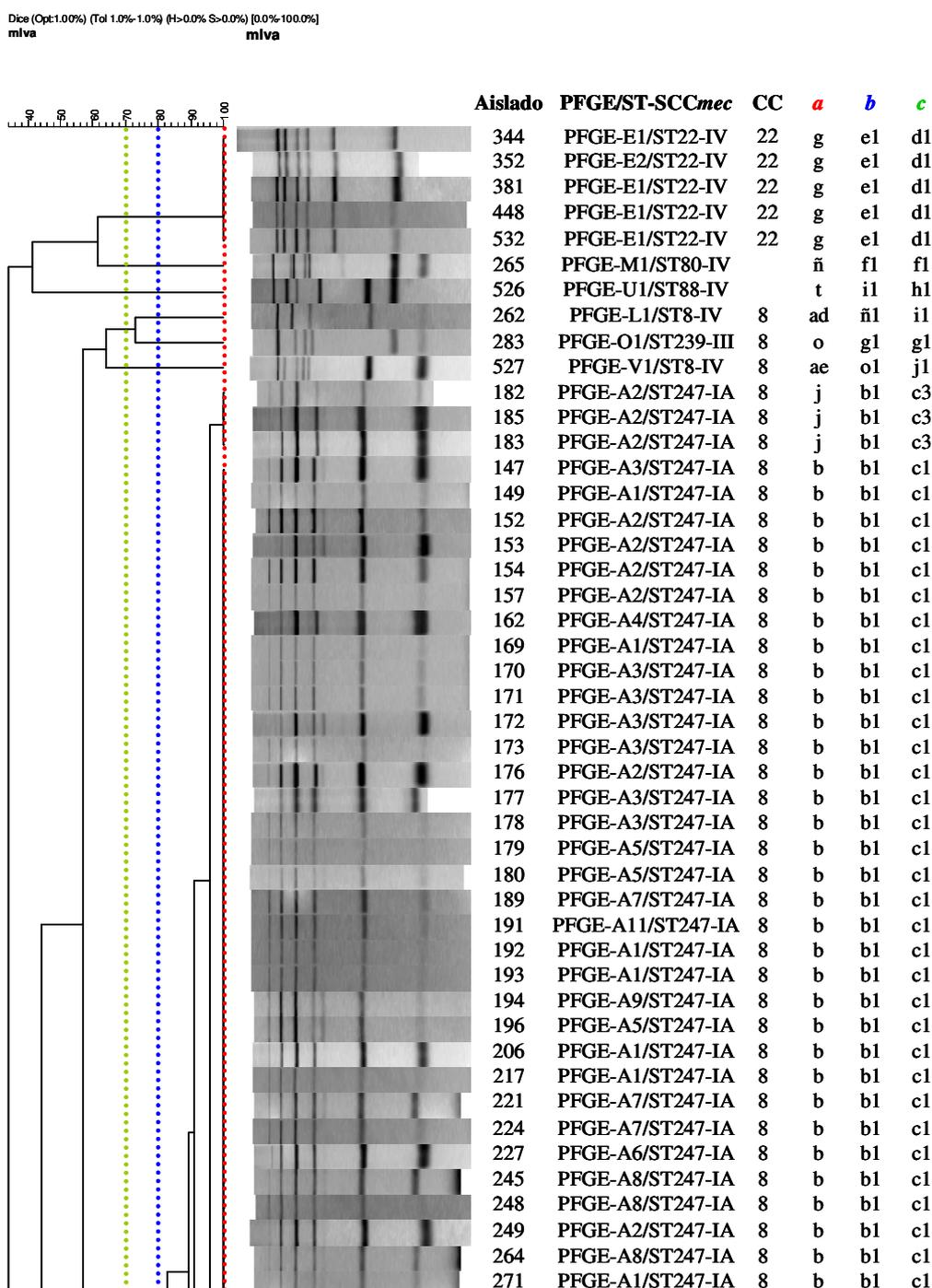
- genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1135-1138.
64. **Rice, K., R. Peralta, D. Bast, J. de Azavedo, M.J. McGavin.** 2001. Description of *Staphylococcus* serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of *sspA*-encoded serine protease. *Infect. Immun.* **69**: 159-169.
65. **Carmona, C., G. L. Gray.** 1987. Nucleotide sequence of the serine protease gene of *Staphylococcus aureus*, strain V8. *Nucleic Acids Research.* **15**: 6757.
66. **van Belkum, A., S. Scherer, L. van Alphen, H. Verbrugh.** 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 275-293.
67. **Malachowa, N., A. Sabat, M. Gniadkowski, J. Krzyszton-Russjan, J. Empel, J. Miedzobrodzki, K. Kosowska-Shick, P.C. Appelbaum, W. Hryniewicz.** 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3095–3100.
68. **Tenover, F.C., R.R. Vaughn, L.K. McDougal, G.E. Fosheim, J.E. McGowan Jr.** 2007. Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2215-2219.
69. **Moser, S.A., M.J. Box, M. Patel, M. Amaya, R. Schelonka, K.B. Waites.** 2009. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* discriminates within U. S. A. pulsed-field gel electrophoresis types. *J. Hosp. Infect.* **71**: 333–339.
70. **Schouls, L.M., E.C. Spalburg, M. van Luit, X.W. Huijsdens, G.N. Pluister, M. G. van Santen-Verheuve, H.G. van der Heide, H. Grundmann, M.E. Heck, A.J. de Neeling.** 2009. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *spa*-typing. *PLoS One.* **4**: e5082.
71. **Holmes, A., G.F. Edwards, E.K. Girvan, W. Hannant, J. Danial, J.R. Fitzgerald, K.E. Templeton.** 2010. Comparison of two multilocus variable-number tandem-repeat methods and pulsed-field gel electrophoresis for

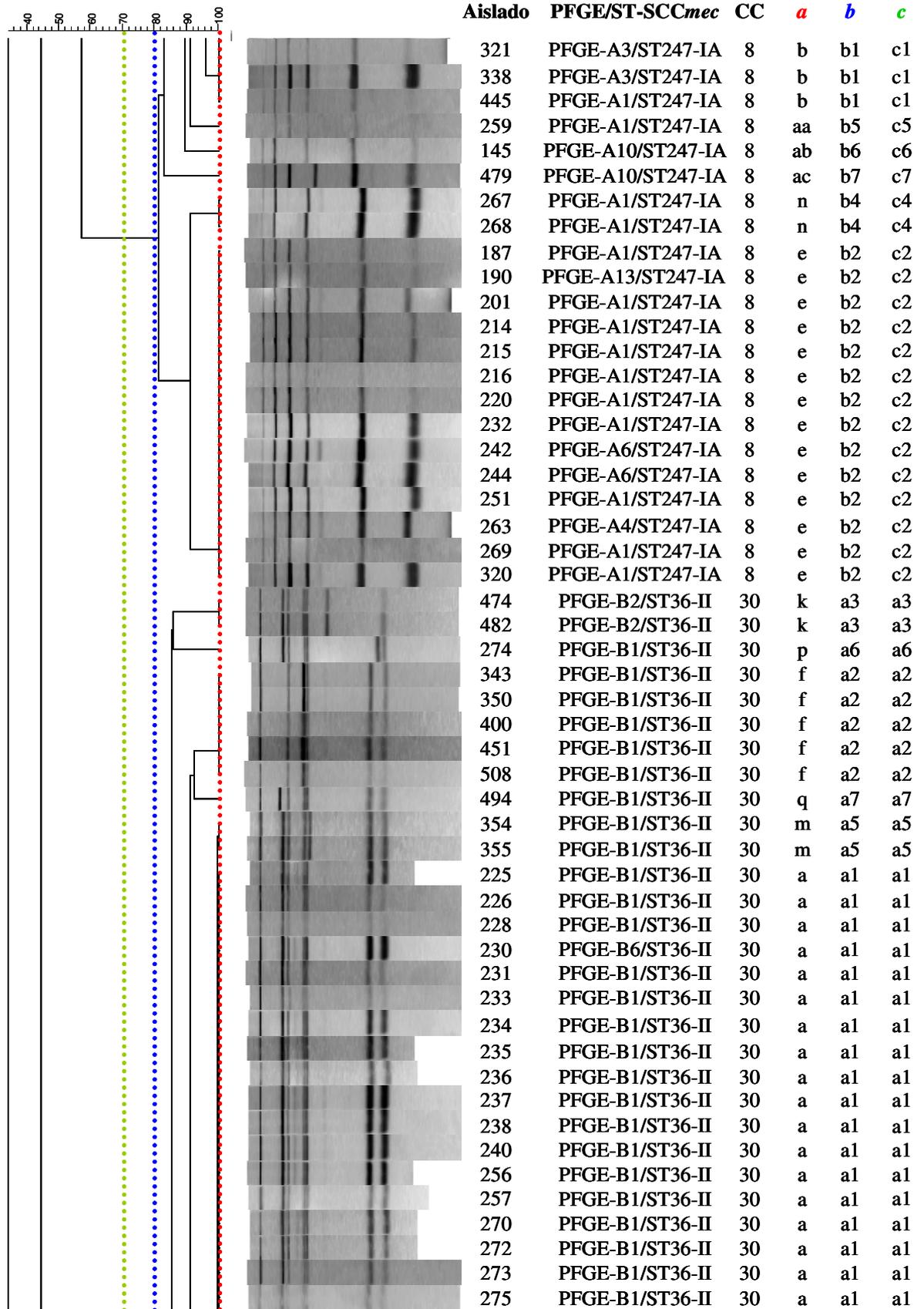
- differentiating highly clonal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3600-3607.
72. **Pérez-Roth, E., F. Lorenzo-Díaz, N. Batista, A. Moreno, S. Méndez-Alvarez.** 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4649-4656.
73. **Rivero-Pérez, B., E. Pérez-Roth, S. Méndez-Alvarez.** 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**: 2991-2994.
74. **Hunter, P.R., M.A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2465-2466.
75. **Peacock, S.J., C.E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, N.P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**: 4987-4996.
76. **van Belkum, A.** 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**: 22-27
77. **Faria, N.A., J.A. Carrico, D.C. Oliveira, M. Ramirez, H. de Lencastre.** 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 136-144.
78. **McDougal, L.K., C.D. Steward, G.E. Killgore, J.M. Chaitram, S.K. McAllister, F.C. Tenover.** 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5113-5120.

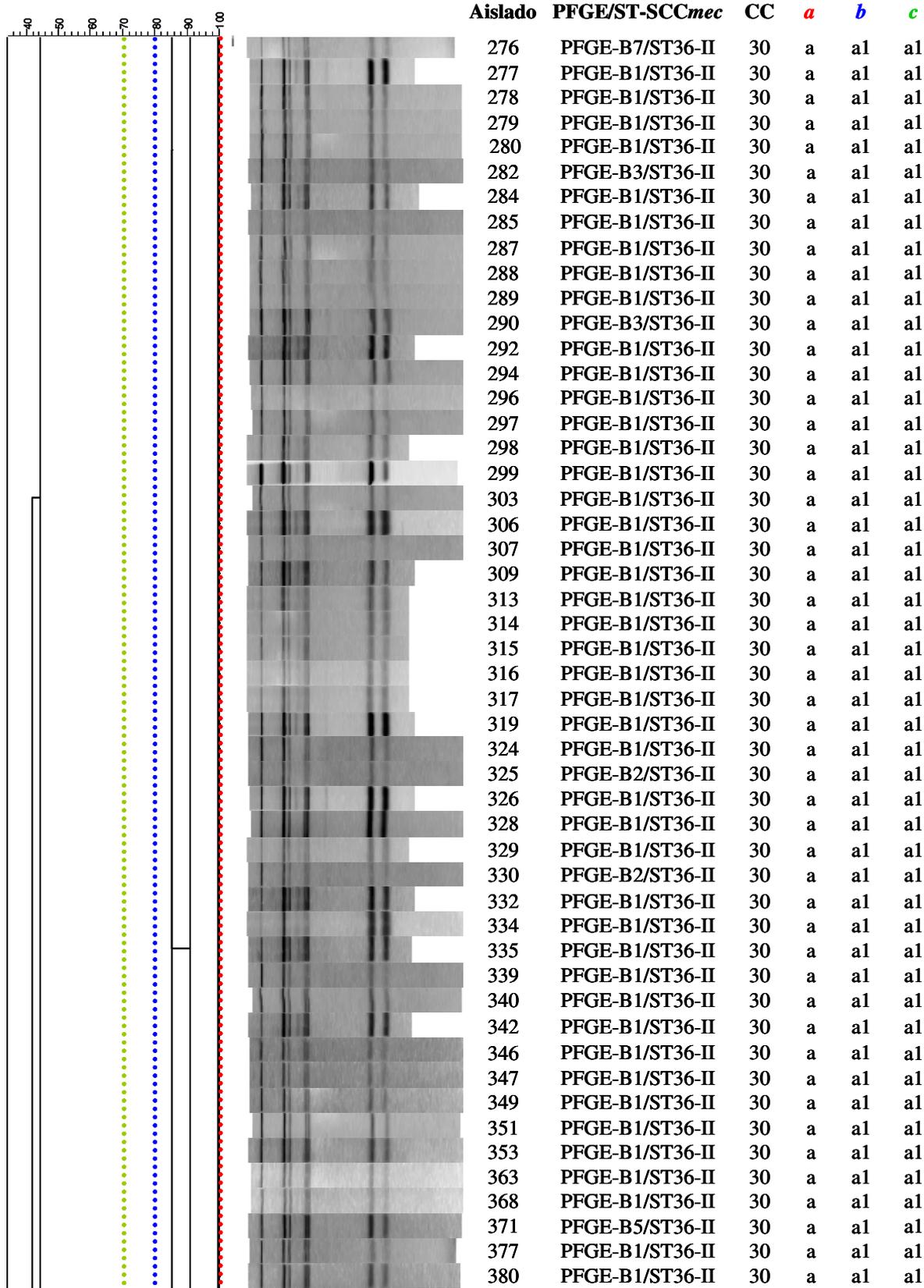
1.8. ANEXOS

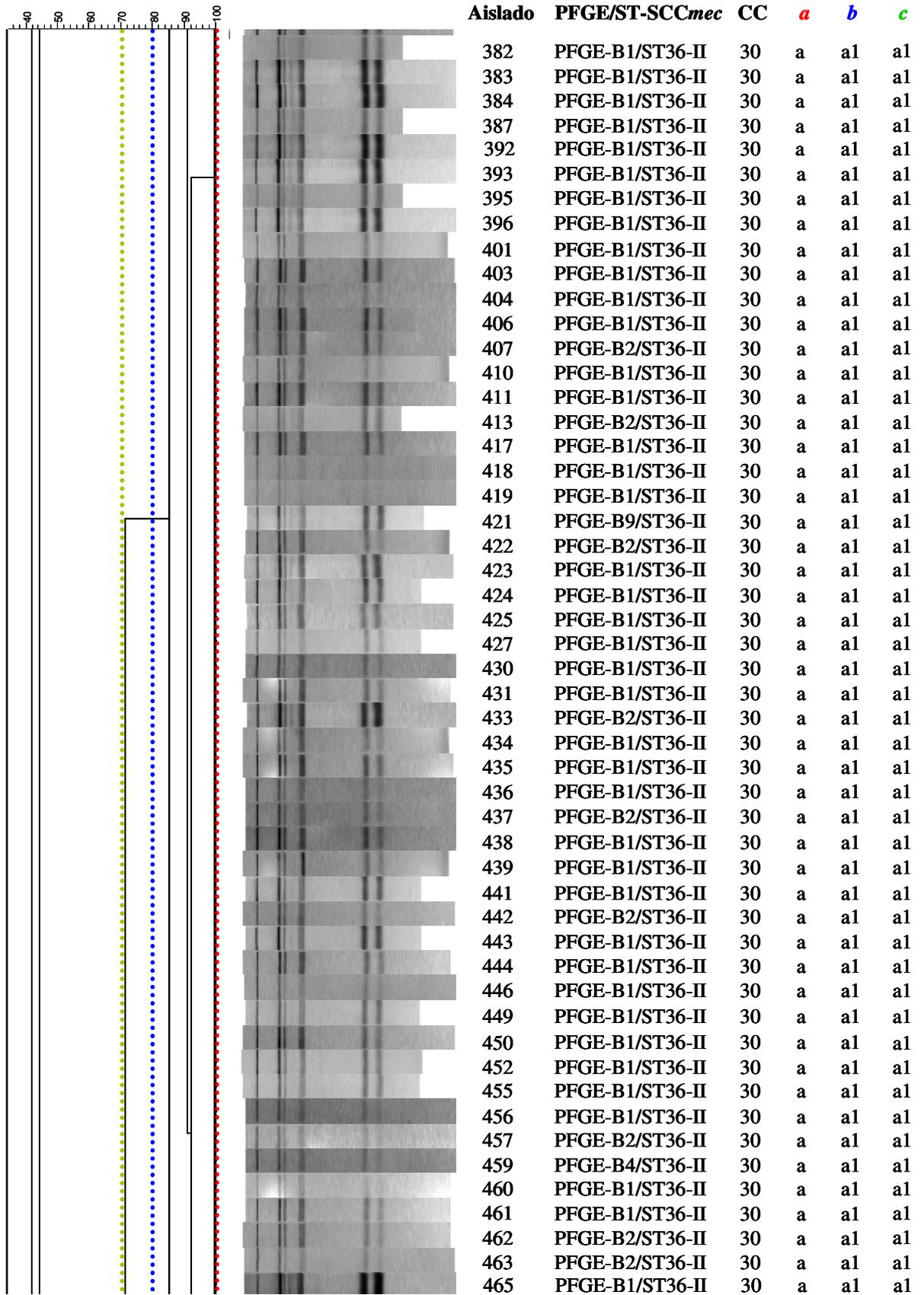
1.8.1. Dendrograma

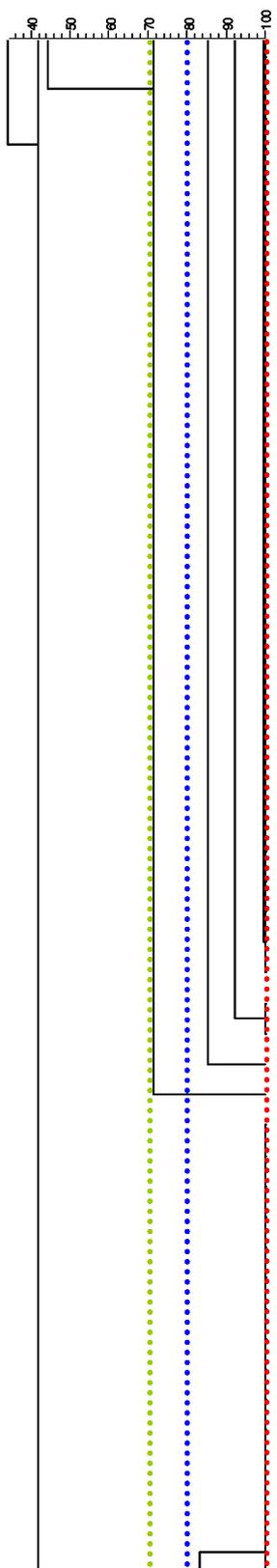
Dendrograma construido con los perfiles de MLVA de todos los aislados SARM incluidos en este estudio, aplicando el coeficiente de Dice y aplicando un valor de tolerancia del 1%. Las líneas de puntos de colores rojo, azul y verde indican los 3 puntos de corte empleados, de una única banda de diferencia, de similitud > 80% y de similitud > 70%, respectivamente. Los tipos y subtipos asignados con cada criterio se encuentran en la tabla de datos bajo las letras *a*, *b* y *c*, también respectivamente.



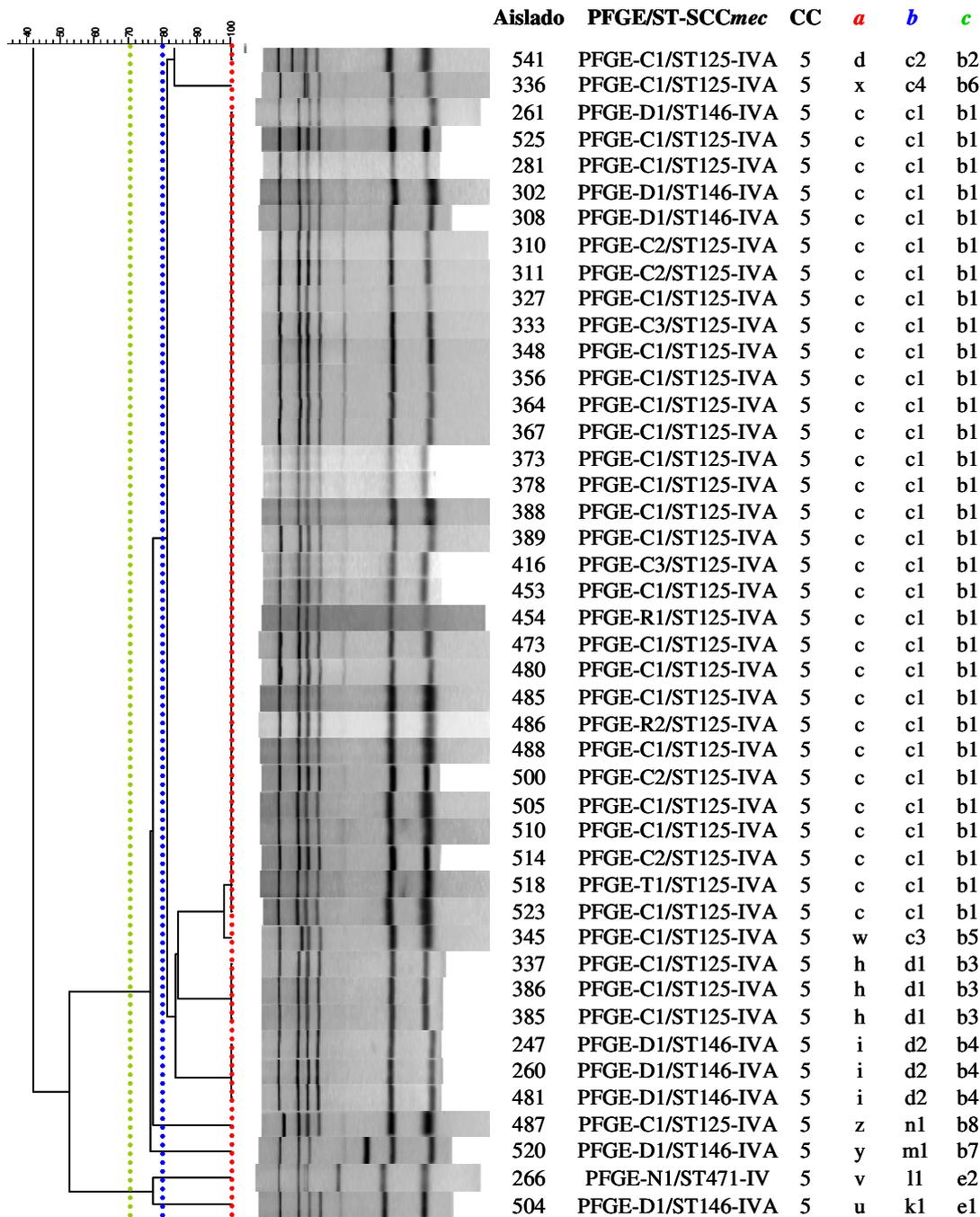








Aislado	PFGE/ST-SCCmec	CC	a	b	c
466	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
467	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
469	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
470	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
472	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
475	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
476	PFGE-B5/ST36-II	30	a	a1	a1
477	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
478	PFGE-B2/ST36-II	30	a	a1	a1
483	PFGE-B8/ST36-II	30	a	a1	a1
484	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
489	PFGE-B4/ST36-II	30	a	a1	a1
490	PFGE-B2/ST36-II	30	a	a1	a1
491	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
493	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
495	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
496	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
498	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
499	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
501	PFGE-B9/ST36-II	30	a	a1	a1
503	PFGE-B2/ST36-II	30	a	a1	a1
513	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
515	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
516	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
519	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
522	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
524	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
528	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
530	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
533	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
536	PFGE-B1/ST36-II	30	a	a1	a1
529	PFGE-B1/ST36-II	30	l	a4	a4
531	PFGE-B1/ST36-II	30	l	a4	a4
426	PFGE-B2/ST36-II	30	r	a8	a8
195	PFGE-F1/ST30-IV	30	s	h1	a9
405	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
408	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
409	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
412	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
414	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
420	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
432	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
458	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
464	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
492	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
534	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
535	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
537	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
538	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1
540	PFGE-C1/ST125-IVA	5	d	c1	b1



1.8.2. Índice de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AR: Método ajustado de Rand

arcC: Carbamato kinasa

aroE: Shikimato deshidrogenasa

BURST: *Based Upon Related Sequence Types*

CC: Complejo clonal o *Clonal Complex*

ccr: *Chromosome cassette recombinase*

D: Índice de Diversidad de Simpson

DLV: Variante en dos *loci* o *Doble-Locus Variant*

glpf: Glicerol kinasa

gmk: Guanilato kinasa

HUNSC: Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

IC: Intervalo de Confianza

Kb: Kilobases

MLST: *Multi-Locus Sequence Typing*

MLVA: *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat*

MSCRAMM: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*

PFGE: Electroforesis en campo pulsado o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

pta: Fosfato acetiltransferasa

R: Índice de Rand

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

SARM-AH: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Adquirido en el Hospital

SASM: *Staphylococcus aureus* Susceptible a Meticilina

SCC*mec*: Casete cromosómico estafilococal *mec* o *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

S_D: Coeficiente de similitud de Dice

SLV: Variante en un único *locus* o *Single-Locus Variant*

SSM: Desapareamiento por deslizamiento de hebra o *Slipped Strand Mismatching*

ST: Tipo de secuencia o *Sequence Type*

TLV: Variante en tres loci o *Triple-Locus Variant*

tpi: Triosa fosfatisomerasa

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*

VNTR: Repeticiones en Tándem en Número Variable o *Variable Number Tandem Repeat*

W: Método de Wallace

yqiL: Acetil coenzima A acetiltransferasa

1.8.3. Publicación relacionada

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2010, p. 2991–2994
0095-1137/10/\$12.00 doi:10.1128/JCM.02220-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 48, No. 8

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[‡]

Belinda Rivero-Pérez,¹ Eduardo Pérez-Roth,^{1†} and Sebastián Méndez-Álvarez^{2*}

Laboratorio de Biología Molecular, Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria,¹ and Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna,² Santa Cruz de Tenerife, Spain

Received 13 November 2009/Returned for modification 12 January 2010/Accepted 21 May 2010

Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) was performed with 292 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates previously characterized by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing, and staphylococcal cassette chromosome *mec* typing. Quantitative correspondence analyses showed the best correlation between data when an $\geq 80\%$ cutoff was applied to MLVA. We confirmed the validity of MLVA for identification of related strains in a polyclonal MRSA population.

The first methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolate was detected in 1961 (8). Since then, MRSA has become one of the most worrisome pathogens worldwide. Many efforts to design an ideal method to type these bacteria and to control their dissemination have been employed (4). Up to now, the gold standard for short-term epidemiological surveillance of *S. aureus* has been pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (5, 6, 7). However, this method is demanding and time-consuming and needs expensive reagents. Multilocus sequence typing (MLST) is the ideal method for long-term epidemiological studies, but its routine application is very unfeasible in clinical laboratories. In 2003, a new method for typing *S. aureus* strains, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA), was applied (18). This technique consists of simultaneous amplification of variable-number tandem repeats of different genes. Several works have tried to determine if MLVA provides enough information to be performed routinely instead of PFGE or MLST in clinical microbiology laboratories (20).

Our aim was to determine if MLVA could predict MRSA clones present in the Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC) that were previously characterized by PFGE, MLST, and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing (reported here as PFGE/MLST-SCC*mec* type) (16) and to establish possible criteria of clustering MLVA patterns, looking for high concordance levels. This study expects to validate MLVA to introduce it as a routine typing method in the HUNSC.

The 292 MRSA isolates included in this study belonged to the clones included in Table 2. MLVA was performed as previously described (18) but slightly modified to obtain optimal

results and to accelerate the process. The PCR mixture was prepared with 1× reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1.2 μM each of ClfA-F, ClfA-R, ClfB-F, ClfB-R, SdrCDE-F, and SdrCDE-R primers, 0.5 μM each of Spa-F and Spa-R primers, 1 μM each of Sspa-F and Sspa-R primers, and 0.05 U of *Taq* DNA polymerase (BioLine). Cycling conditions (MyCycler; Bio-Rad) were 94°C for 5 min, 20 cycles of 94°C for 30 s, 58.2°C for 45 s, and 72°C for 1.5 min, and finally 72°C for 5 min. To assess reproducibility, 10 randomly chosen isolates of different MLVA types were used for three independent MLVA experiments. The dendrogram obtained by Dice's coefficient with a 1% tolerance value was analyzed using three different cutoffs. Simpson's index of diversity, *D* (19), was employed to measure the discriminatory powers of MLVA and PFGE/MLST-SCC*mec* typing (9, 12), and concordance levels between these methods were quantified using two coefficients, adjusted Rand (AR) (11) and Wallace (W) (17, 22), as Carrigo et al. suggested (2).

All 292 MRSA isolates were typeable by MLVA. Interestingly, it was possible to optimize the results by running the five pairs of primers in the same reaction, described as a difficult technique (20). Also, the PCRs were performed successfully from cellular suspensions without DNA extraction. The intra-laboratory reproducibility of MLVA was very high (100%), as previously noted by other authors (13, 20).

By application of the previously established criterion in which two isolates with any different band were classified as two distinct MLVA types (18), MLVA produced 35 distinct patterns, showing a *D* value of 71.33% (range, 66.14 to 76.52%). Although PFGE showed a lower value, *D* of 68.47% (64.07 to 72.88%), the difference was not significant. The isolates were divided into 14 clusters (a to n), and 21 organisms had unique MLVA patterns (ñ to ah). The PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II, PFGE-C/ST125-IVA, and PFGE-D/ST146-IVA clones were divided into different MLVA types. All of the PFGE-E/ST22-IV isolates were clustered together, and each sporadic MRSA clone corresponded with one MLVA type. Therefore, we are able to rule out relationships but not to

* Corresponding author. Mailing address: Unidad de Investigación, Hospital U. Ntra. Sra. De Candelaria, Ctra. Del Rosario 100, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain. Phone: 34-922600080. Fax: 34-922600562. E-mail: sebastianmendez@funcis.org.

† Present address: Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, Universidad de La Laguna, C/Astrofísico Francisco Sánchez, 2, 38206 La Laguna, Spain.

[‡] Published ahead of print on 2 June 2010.

TABLE 1. Correlation between MLVA using 3 cutoff criteria and different methods for the identification of MRSA clones^a

Alternate method(s)	Correlation established using MLVA with cutoff of:					
	One band		>80% relatedness		>70% relatedness	
	AR (ratio)	W (%)	AR (ratio)	W (%)	AR (ratio)	W (%)
PFGE type/MLST-SCC _{mec} typing	0.794	98.71 (97.93–99.45)	0.976	98.29 (97.11–99.33)	0.967	96.08 (93.35–98.08)
PFGE subtype/MLST-SCC _{mec} typing	0.644	69.21 (61.01–77.38)	0.696	65.86 (58.51–73.12)	0.688	64.62 (57.15–71.59)
PFGE type/MLST-SCC _{mec} typing and CC determination	0.794	98.71 (97.93–99.45)	0.976	98.29 (97.11–99.33)	0.967	96.08 (93.35–98.08)
PFGE subtype/MLST-SCC _{mec} typing and CC determination	0.644	69.21 (61.01–77.38)	0.696	65.86 (58.51–73.12)	0.688	64.62 (57.15–71.59)
CC determination	0.765	100	0.957	100	0.986	100

^a Boldface type shows the values indicating the best cutoff criteria to detect MRSA clones previously identified by PFGE/MLST-SCC_{mec} typing and to cluster isolates belonging to the same CC.

establish them. The quantitative analyses showed low congruence values and even lower values when the PFGE subtypes were considered (Table 1). Tenover et al. obtained similar results with a visual analysis determining if MLVA could predict USA strain PFGE types. Then, they applied the >80% and >75% relatedness cutoff criteria (20). We tested other criteria and the >80% and >70% relatedness cutoffs, as previously proposed (13, 20).

By use of the >80% relatedness cutoff, the number of MLVA types was reduced from 35 to 17, reducing the *D* value to 61.82% (57.00 to 66.04%). The 17 MLVA types included 5 clusters of >1 organism and 12 unique MLVA patterns (Table 2). The PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II, and PFGE-E/ST22-IV clones corresponded with the MLVA types b, a, and e, respectively. Therefore, we were successful in grouping MRSA isolates to the same clone, although the distributions of the MLVA subtypes and the PFGE subtypes did not correspond. Subtype A1, the so-called Iberian clone, showed the same MLVA pattern as the other A subtypes (A2 to A13) (Fig. 1), and the same happened with subtypes B1 (Fig. 1) and E1, the so-called EMRSA-16 and EMRSA-15 clones, respectively. Therefore, MLVA could predict the PFGE/MLST-SCC_{mec} types, but it could not distinguish the possible outbreaks of

particular PFGE subtypes, being important above all in epidemic clones, such as the Iberian, EMRSA-16, and EMRSA-15 clones, present in our hospital. The quantitative analysis with and without PFGE subtype data demonstrated this observation (Table 1). On the other hand, the PFGE-C/ST125-IVA and PFGE-D/ST146-IVA clones were difficult to distinguish by MLVA, since both clones showed mixed MLVA types c and d (Table 2). These clustering differences of MLVA were observed by Tenover et al., applying the 80% and 75% cutoff criteria, with USA strain PFGE types. For example, USA100 isolates were clustered together in the same MLVA type, whereas USA800 isolates were separated into six different MLVA types. They suggested that the variability of the MLVA patterns may be strain dependent (20). Even so, congruence levels in our study upon application of this criterion were very high (Table 1). Therefore, MLVA typing could be a useful tool to localize and to follow the movement of these MRSA strains inside the hospital and, thus, to reduce the number of nosocomial infections, just as was described previously (3, 10).

Use of the >70% relatedness cutoff reduced the number of MLVA types from 17 to 11, showing a *D* of 60.48% (55.92 to 65.04%). The 11 MLVA types included 5 clusters of >1 organism and 6 unique MLVA patterns (Table 2). As with the

TABLE 2. Classifications of different MRSA clones obtained by application of 80% and 70% cutoff criteria, indicating the MLVA types and subtypes

CC	PFGE/MLST-SCC _{mec} type, no. (%) of isolates	No. (name(s)) of PFGE subtypes at >80% cutoff	Total no. of MLVA types in CC	>80% cutoff		>70% cutoff		
				MLVA type	No. (name(s)) of MLVA subtypes	Total no. of MLVA types in CC	MLVA type	No. (name(s)) of MLVA subtypes
8	PFGE-A/ST247-IA, 58 (15.59) PFGE-L/ST8-IVA, 1 (0.34) PFGE-V/ST8-IV, 1 (0.34) PFGE-Q/ST239-III, 1 (0.34)	12 (A1 to A12) 1 (L1) 1 (V1) 1 (Q1)	4	b	7 (b1 to b7)	4	c	7 (c1 to c7)
30	PFGE-B/ST36-II, 164 (55.41) PFGE-F/ST30-IV, 1 (0.34)	9 (B1 to B9) 1 (F1)	2	a	8 (a1 to a8)	1	a	9 (a1 to a9)
5	PFGE-C/ST125-IVA, 50 (16.89) PFGE-D/ST146-IVA, 8 (2.70) PFGE-D/ST471-IV, 1 (0.34)	3 (C1 to C3) 1 (D1) 1 (N1)	6	c, d, n c, d, k, m l	4 (c1 to c4), 1 (d1), 1 (n1) 1 (k1), 1 (m1) 1 (l1)	2	b, e e	6 (b1 to b3, b5, b6, b8) 3 (b1, b4, b7), 1 (e2) 1 (e3)
22	PFGE-E/ST22-IV, 5 (1.69)	2 (E1, E2)	1	e	1 (e1)	1	d	1 (d1)
Unknown	PFGE-M/ST80-IV, 1 (0.34) PFGE-U/ST88-IV, 1 (0.34)	1 (M1) 1 (U1)	1	f	1 (f1)	1	f	1 (f1)
			1	i	1 (i1)	1	h	1 (h1)
Total	12 ^a	34	16		31	10		32

^a Total number of different PFGE/MLST-SCC_{mec} types.

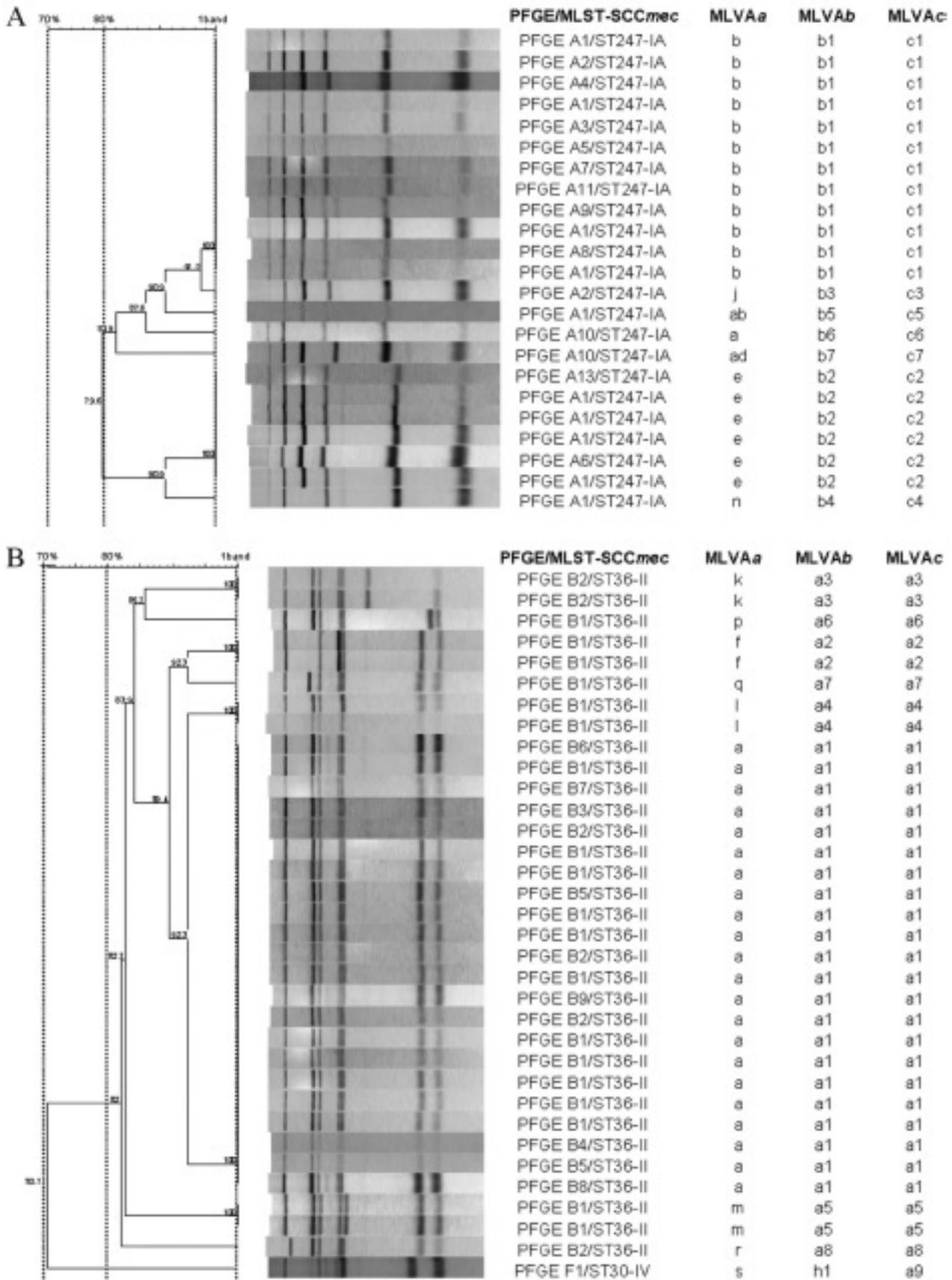


FIG. 1. Classification of the Iberian clone (PFGE-A1/ST247-IA) (A) and the EMRSA-16 clone (PFGE-B1/ST36-II) (B) into different MLVA types and subtypes depending on the cutoff criterion (a, 1 band; b, 80% relatedness; c, 70% relatedness) and relationships to the other PFGE subtypes. The gel images were analyzed with InfoQuest software, version 4.5 (Bio-Rad).

>80% cutoff, the PFGE-A/ST247-IA, PFGE-B/ST36-II, and PFGE-E/ST22-IV isolates each belonged to a different MLVA type (Fig. 1). However, by use of this less stringent criterion, the single isolate PFGE-F/ST30-IV was clustered together with the PFGE-B/ST36-II isolates, both belonging to clonal complex 30 (CC30). The PFGE-C/ST125-IVA and PFGE-D/ST146-IVA clones were mixed again, except one PFGE-D/ST146-IVA isolate that was clustered together with the PFGE-N/ST471-IV clone, both belonging to CC5 (Table 2). Therefore, the MLVA types represented MRSA isolates with different PFGE/MLST-SCCmec types, which was proven with the quantitative analysis (Table 1). Malachowa et al. determined a good correlation between MLVA and PFGE by applying a 70% cutoff for MLVA but a 75% cutoff for PFGE (13). Nevertheless, we do not agree with the change from an 80% cutoff for PFGE, since it is a justified and internationally accepted criterion (20). In that study, Malachowa et al. found that MLVA (70% cutoff) grouped isolates with the same CC, although with some exceptions. The exception in our study was CC8, where the different strains were not grouped together (Table 2). At a quantitative level, the values obtained in the analysis including the corresponding CCs together with PFGE/MLST-SCCmec types did not vary, while in the analysis comparing MLVA and CCs only, the AR and W values increased to 0.98 and 100%, respectively (Table 1).

Developing an efficient strategy to prevent the dissemination of MRSA clones and to provide optimal treatment for patients is of paramount importance. However, in many hospitals, the resources are not available for PFGE or MLST, techniques par excellence chosen in epidemiological studies. As a result, our aim has been to validate a method described as cheap, fast, and easy to use for analysis of hospital-acquired MRSA. Our efforts validate MLVA as a routine typing technique, reaching an agreement between the efficacy and the efficiency, as Trindade et al. suggested (21). Since the concordance levels between typing methods can vary depending on the collection of isolates, different studies of the correlation of MLVA and other techniques have led to various conclusions (15, 18, 20). In our analysis, MLVA could predict MRSA clones previously identified by PFGE/MLST-SCCmec typing (16), with the highest congruence between both methods achieved when we applied the 80% cutoff criterion. Also, the 70% cutoff criterion could be used to cluster isolates that belong to the same CC. Furthermore, MLVA has been described to provide a solid basis for the assignment of different genetic variants, which is useful information for epidemiological tracking (14).

In conclusion, this study demonstrates the ability of MLVA to distinguish among different MRSA reservoirs and other circulating MRSA strains in the HUNSC. The proven simplicity, low cost, and speed of MLVA enable the performance of routine checkups in patients, mainly via admission screening on surgical wards and in intensive care units, hampering the spread of these strains and therefore reducing the morbidity, mortality, and costs (1, 3, 10).

We thank Santiago Basaldua Lemarchand for his mathematical support and Joao Carriço for his helpful availability.

This work was supported partially by grant FIS06/0002 from the Spanish Health Ministry to S.M.-A. We thank the MAPFRE Foundation and COFARTE, a pharmaceutical company from Tenerife, for their founding

contributions for the development of this study. B.R.-P. was supported partially by the MAPFRE Foundation and by COFARTE.

REFERENCES

- Abramson, M. A., and D. J. Sexton. 1999. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremias at what costs? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 20:408-411.
- Carriço, J. A., C. Silva Costa, J. Melo-Cristino, F. R. Pinto, H. De Lencastre, J. S. Almeida, and M. Ramirez. 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 44:2524-2532.
- Chaborny, L. F., F. Schwab, S. Ziesing, S. Suorbaum, and P. Gastmeier. 2008. Impact of routine surgical ward and intensive care unit admission surveillance cultures on hospital-wide nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a university hospital: an interrupted time-series analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:1422-1429.
- Crisóstomo, M. L., H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, and H. de Lencastre. 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:9865-9870.
- Crossley, K., B. Landsman, and D. Zaska. 1979. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. *J. Infect. Dis.* 139:280-287.
- El Helali, N., A. Carbonne, T. Naas, S. Kernés, O. Fresco, Y. Giovannardi, N. Fortinneau, P. Nordmann, and P. Astagneau. 2005. Nosocomial outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome in neonates: epidemiological investigation and control. *J. Hosp. Infect.* 61:130-138.
- Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Fell, H. Grundmann, and B. Spratt. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:7687-7692.
- Erikson, K. R., and I. Erichsen. 1953. Clinical occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Ugeskr. Laeg.* 125:1234-1240.
- Grundmann, H., S. Hori, and G. Tanner. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39:4190-4192.
- Huang, S. S., D. S. Yokoe, V. L. Hinrichsen, L. S. Sparsholtz, R. Damm, I. Miroshnik, and R. Platt. 2006. Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 43:971-978.
- Hubert, L., and P. Arabie. 1985. Comparing partitions. *J. Classification* 2:193-218.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465-2466.
- Malachowa, N., A. Sabat, M. Gniadkowska, J. Krzyszton-Russjan, J. Empel, J. Miedzobrodzki, K. Kosowska-Shlek, P. C. Appelbaum, and W. Bryniewicz. 2005. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:3095-3100.
- Melles, D. C., L. Schouls, P. François, S. Hertz, H. A. Verbrugh, A. van Belkum, and J. Schrenzel. 2009. High-throughput typing of *Staphylococcus aureus* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) or multi-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) reveals consistent strain relatedness. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28:39-45.
- Moser, S. A., M. J. Box, M. Patel, M. Amaya, R. Schelonka, and K. B. Whitte. 2009. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* discriminates within U. S. A. pulsed-field gel electrophoresis types. *J. Hosp. Infect.* 71:333-339.
- Pérez-Roth, E., F. Lorenzo-Díaz, N. Batista, A. Moreno, and S. Méndez-Álvarez. 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42:4649-4656.
- Pinto, F. R., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2008. A confidence interval for the Wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. *PLoS ONE* 3:e3696.
- Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filippek, K. Kosowska, W. Bryniewicz, J. Travis, and J. Potempa. 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.* 41:1801-1804.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of species diversity. *Nature* 163:688.
- Tenover, F. C., R. R. Vaughn, L. K. McDougal, G. E. Foshelm, and J. E. McGowan, Jr. 2007. Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45:2215-2219.
- Trindade, P. A., J. A. McCulloch, G. A. Oliveira, and E. M. Mamiruka. 2003. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz. J. Infect. Dis.* 7:32-43.
- Wallace, D. L. 1983. A method for comparing two hierarchical clusterings: comment. *J. Am. Stat. Assoc.* 78:569-576.

Capítulo 2

Epidemiología molecular de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina asociados a la comunidad en la isla de Tenerife

Tabla de contenidos

2.1 INTRODUCCIÓN	71
2.1.1. Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
2.1.2. Genoma	73
2.1.2.1 Genoma central	74
2.1.2.2 Genoma accesorio	74
2.1.3. Proceso de infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	79
2.1.4. Evolución de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
2.1.4.1 Adquisición de resistencias	83
2.1.4.1.1 Resistencia a la meticilina	84
2.1.4.1.2 Resistencia a la mupirocina	89
2.1.4.2 Emergencia de SARM en la comunidad	92
2.1.5. Prevención de infecciones por SARM-AC	103
2.2. OBJETIVOS.....	106
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	107
2.3.1 Aislados clínicos, pacientes y período de estudio	107
2.3.2 Identificación fenotípica	109
2.3.3 Pruebas de sensibilidad antibiótica	109
2.3.4 Identificación molecular de los SARM	110
2.3.5 Detección de los genes codificantes de las toxinas PVL y Hlg- γ mediante PCR.....	112
2.3.6 Confirmación de genes mediante secuenciación	113
2.3.7 Determinación de la localización del gen <i>ileS2</i>	116
2.3.8 Análisis de expresión del gen <i>ileS2</i>	120
2.3.9 Identificación mediante PCR del tipo estructural de <i>SCCmec</i>	124
2.3.10 Métodos de tipificación molecular.....	128
2.3.10.1 Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	128
2.3.10.2 Análisis de repeticiones en tándem en número variable en varios <i>loci</i> ..	132
2.3.10.3 Tipificación <i>spa</i>	132

2.3.10.4 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	134
2.4. RESULTADOS	136
2.4.1 Aislados clínicos, pacientes y período de estudio	136
2.4.2 Infecciones	137
2.4.3 Patrones de susceptibilidad antimicrobiana	138
2.4.4 Resistencia altas concentraciones de mupirocina	139
2.4.5 Expresión del gen <i>ileS2</i>	140
2.4.6 Toxinas	144
2.4.7 Tipificación	145
2.5. DISCUSIÓN	153
2.6. CONCLUSIONES	164
2.7. BIBLIOGRAFÍA	166
2.8. ANEXOS	212
2.8.1 Índice de abreviaturas	212
2.8.2 Tablas de cebadores.....	215
2.8.3 Publicación relacionada	219

Tabla de Figuras

Figura 2. 1. Dos aislados de <i>S. aureus</i> que muestran distinta coloración y que en 1884 fueron separadas, por ello, en dos especies diferentes: <i>S. aureus</i> (colonias doradas) y <i>S. albus</i> (colonias blancas).....	72
Figura 2. 2. Estado de agrupación en racimo típico de <i>S. aureus</i>	73
Figura 2. 3. Localización en el cuerpo humano de los lugares frecuentes de colonización por <i>S. aureus</i>	79
Figura 2. 4. Representación de la unión de la proteína A a la región Fc de las inmunoglobulinas ⁷⁴	81
Figura 2. 5 Representación esquemática de algunos de los diferentes factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de <i>S. aureus</i>	82
Figura 2. 6. A. Interrupción de la síntesis de la pared celular de <i>S. aureus</i> mediante un antibiótico β -lactámico, el cual se une a la PBP, bloqueando su sitio activo. B. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos en cepas SARM mediante la producción de la PBP2a, sin afinidad por dicho grupo de antimicrobianos.....	85
Figura 2. 7. Representación esquemática de los principales tipos de SCCmec descritos hasta el momento.	86
Figura 2. 8 Representación propuesta por Deurenberg y Stobberingh sobre el origen evolutivo de algunos de los mayores clones SARM descritos, así como su posible adquisición de la toxina de Panton-Valentine o PVL ¹⁵⁶ . Las flechas indican adquisición o cambio del tipo de SCCmec, un cambio de ST o la adquisición de los genes <i>pvl</i> . Los círculos de color malva indican los clones pertenecientes al CC30, mientras que los rosa muestran los pertenecientes al CC8. La cepa ST238-SARM-III, presentada con ambos colores, ha evolucionado adquiriendo un fragmento cromosómico de 557 pb del ST30 en un linaje ST8 ^{8,154,157}	88
Figura 2. 9. Esquema de grupos de riesgo detectados en la sociedad para padecer infección por SARM-AC.	93
Figura 2. 10. Mecanismo de inflamación y daño del pulmón inducidos por el PVL en el alveolo, propuesto por Diep <i>et al.</i> ²⁹⁹ , comparado con un alveolo normal. En su ilustración, indica con flechas negras los sucesos que observaron en su estudio, mientras que las flechas grises señalan los eventos que postulan.	99

Figura 2. 11. Representación del modelo propuesto por Boyle-Vavra y Daum ³⁰³ , sobre cómo causa el PVL necrosis del tejido. En esta propuesta, la alta concentración del PVL produce lisis de los PMNs, mientras que concentraciones bajas de la toxina median una vía de apoptosis de los PMNs, actuando directamente en la membrana mitocondrial ³²⁰	100
Figura 2. 12. Esquema de la isla de Tenerife. En rojo se encuentran señalados los municipios de donde procedieron las muestras incluídas en este estudio, indicando el número (<i>n</i>) de aislados SARM recuperado en cada uno de ellos. El punto negro indica el lugar donde se halla ubicado el HUNSC.....	108
Figura 2. 13. Esquema del programa de la PCR triple empleada para la amplificación de los genes <i>femB</i> , <i>ileS2</i> y <i>mecA</i> ³⁵⁴	111
Figura 2. 14. Esquema del programa de la PCR empleado para la amplificación de los genes que codifican para la toxina PVL.....	112
Figura 2. 15. Esquema del programa de la PCR empleado para la amplificación de los genes que codifican para la toxina Hlg- γ	112
Figura 2. 16. Esquema del programa empleado para realizar las reacciones de secuenciación de los genes <i>femB</i> , <i>ileS2</i> , <i>mecA</i> , <i>pvl</i> y <i>hlg-γ</i> , válido además para todos los fragmentos de genes secuenciados en esta tesis doctoral.....	114
Figura 2. 17. Representación del programa de amplificación de la PCR en tiempo real. Las posiciones de las cámaras de fotos ilustran los puntos de toma de datos.....	123
Figura 2. 18. Esquema del programa de amplificación empleado para la determinación del tipo de SCC <i>mec</i> según la estrategia de Oliveira ³⁵⁹	125
Figura 2. 19. Amplificación de los tipos de SCC <i>mec</i> I y II según el método de Oliveira ³⁵⁹ . Carriles del 1-4 corresponden con el SCC <i>mec</i> tipo I y el carril 5 con su variante IA. Los carriles del 6-8 corresponden con el SCC <i>mec</i> tipo II.....	126
Figura 2. 20. Amplificación de los tipos de SCC <i>mec</i> III y IV según el método de Oliveira ³⁵⁹ . Carriles 1 y 2 corresponden con el SCC <i>mec</i> tipo III, 3 y 4 con su variante IIIA y 5 con su variante IIIB. Carriles del 6-10 corresponden con el SCC <i>mec</i> tipo IV.....	126
Figura 2. 21. Amplificación de los tipos de SCC <i>mec</i> según el método de Milheiriço <i>et al.</i> ³⁶⁰ . Los carriles del 1-6 corresponden con los SCC <i>mec</i> I-VI, respectivamente.	127
Figura 2. 22. Gel en el interior de la cubeta del sistema CHEF de electroforesis de campo pulsado. El ángulo de 120° indicado, es el ángulo de reorientación del campo eléctrico entre los diferentes lados del hexágono en el que están distribuidos los electrodos.....	131

Figura 2. 23. Representación de gen <i>spa</i> . Los rectángulos muestran las regiones codificantes del gen. De la A a la D corresponde con la región de unión a la IgG. La zona roja muestra el extremo carboxilo terminal que está formado por Xr, donde se encuentran incluídas las repeticiones, y Xc, que corresponde con la secuencia de anclaje a la pared celular. Las flechas verdes indican las zonas de hibridación de los cebadores.....	133
Figura 2. 24. Programa de amplificación del gen <i>spa</i>	133
Figura 2. 25. Programa de amplificación de cada uno de los genes empleados para el análisis MLST ³⁶³	135
Figura 2. 26. Gráfico que representa la distribución de los aislados SARM recuperados de cada grupo de edad establecido en este estudio.	136
Figura 2. 27. Histograma que refleja el número de aislados que se recuperaron de las distintas muestras clínicas, donde se puede observar cómo las muestras pertenecientes a SSTIs superan el 75% del tamaño muestral.	137
Figura 2. 28. Fenotipos distintos observados en la determinación de resistencia a altas concentraciones de mupirocina mediante E-test. A muestra el aislado 1076, que presentó crecimiento homogéneo en césped cubriendo toda la superficie de la placa. B muestra el aislado 1012, en el que el crecimiento alrededor de la tira de antibiótico no cubrió toda la superficie de la placa.	139
Figura 2. 29. Imagen de los perfiles plasmídicos obtenidos, mostrando en este caso 18 de los 27 aislados <i>ileS2</i> ⁺ , correspondientes con los carriles no marcados. Los carriles indicados con la letra M, corresponden con el marcador de peso molecular II (Roche Diagnostics, Suiza). El recuadro rojo enmarca las bandas en las que se detectó hibridación con la sonda <i>ileS2</i> , revelando, por tanto, los plásmidos portadores de este gen.	140
Figura 2. 30. Imagen ofrecida por el sistema automático de electroforesis Experion (Bio-rad, Estados Unidos) donde se pueden observar las extracciones de ARN total, sin contaminación por ADN.....	141
Figura 2. 31. Gráficos correspondientes a las rectas obtenidas a partir de diluciones seriadas del ADNc de los dos genes incluidos en el estudio. En ellas se puede apreciar los coeficientes de correlación, las pendientes y las eficiencias de cada uno.	142
Figura 2. 32. Representación del número de veces que se expresa el gen <i>ileS2</i> en los aislados SARM incluidos en el estudio, en relación a la muestra de referencia. Las tres primeras barras pertenecen al grupo con fenotipo de resistencia a altas concentraciones de mupirocina de	

densidad incompleta, mientras que los restantes, pertenecen al fenotipo de densidad incompleta. Se observa cómo todos los aislados del primer grupo presentaron una menor expresión del gen *ileS2*, mientras que los del segundo grupo expresan dicho gen en mayor medida. Se encontró una excepción en el aislado 968, coloreado en rojo, cuya expresión del gen presentó los niveles más bajos..... 144

Figura 2. 33. Dendrograma obtenido mediante el coeficiente de Dice, aplicando un 1% de tolerancia, según los patrones de PFGE. Simultáneamente se muestra el perfil de MLVA obtenido para cada aislado. 146

Figura 2. 34. Representación de los 21 tipos distintos de *spa* detectados en este estudio, obtenida mediante el programa Phyloviz (<http://www.phyloviz.net/wiki/>). 148

Figura 2. 35. Representación mediante eBURST de la relación entre el CC8 y el CC72. Marcado en rosa se encuentra el nuevo ST, ST1434, intermediario genético entre el ST72 y el ST990. 161

Tabla de Tablas

Tabla 2. 1 Microorganismos tipos usados como control y/o marcador en los estudios posteriores.	108
Tabla 2. 2. Dianas génicas específicas y tamaño de los amplicones obtenidos en los diferentes tipos de SCC <i>mec</i> según la estrategia de Oliveira ³⁵⁹	125
Tabla 2. 3. Dianas génicas específicas y tamaño de los amplicones obtenidos en los diferentes tipos de SCC <i>mec</i> según la estrategia de Milheiriço ³⁶⁰	127
Tabla 2. 4. Trece perfiles de susceptibilidad antimicrobiana detectados entre los 95 aislados SARM. La tabla muestra el número de aislados pertenecientes perfil de susceptibilidad, así como el porcentaje de aislados resistentes a cada antibiótico de manera independiente.	138
Tabla 2. 5. Datos referidos a las concentraciones de ARN obtenidas para cada aislado y su correspondiente cociente 260/280, tras la primera extracción con el kit <i>RNeasy Mini</i> (Qiagen, Alemania) y tras su purificación manual con DNasa.	141
Tabla 2. 6. Resultados obtenidos aplicando el método de cuantificación relativa a partir de los Cts obtenidos para cada aislado, tomando como referencia el aislado 1003.	143
Tabla 2. 7. Resumen de las características clínicas y moleculares de los aislados SARM y SASM recuperados de la comunidad en la isla de Tenerife.	148
Tabla 2. 8. Secuencias de los cebadores empleados en la identificación de SARM y en la detección del gen <i>ileS2</i>	215
Tabla 2. 9. Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación de los genes que codifican para las toxinas PVL y Hlg- γ	215
Tabla 2. 10. Cebadores empleados para la estrategia de PCR en tiempo real.	215
Tabla 2. 11. Cebadores empleados para la determinación del tipo estructural de SCC <i>mec</i> mediante PCR múltiple.	216
Tabla 2. 12. Cebadores empleados para la tipificación de los aislados SARM mediante el MLVA.	217
Tabla 2. 13. Cebadores empleados para la tipificación de los aislados SARM mediante la secuenciación de la proteína A.	217
Tabla 2. 14. Cebadores empleados para la amplificación por PCR y secuenciación en el análisis mediante MLST.	218

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1. Características generales de *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* se clasifica según la siguiente taxonomía:

* Dominio: *Bacteria*

* Filo: *Firmicutes*

* Clase: *Bacilli*

* Orden: *Bacillales*

* Familia: *Staphylococcaceae*

* Género: *Staphylococcus*

Los estafilococos son cocos *Gram* positivos que se presentan como células aisladas, en pareja o en tetrada, pero más frecuentemente en forma de racimos irregulares. El nombre del género hace referencia a este último tipo de agrupación, derivando del nombre griego *staphyle*, que significa “racimo de uva”¹. Los representantes de este género no son móviles, no forman esporas, son anaerobios facultativos y normalmente son catalasa positivos.

Este género pertenece a un grupo de bacterias caracterizadas por un bajo contenido en G+C en su genoma, y a él pertenecen especies bien estudiadas, debido a que causan frecuentemente infecciones en humanos y animales.

En este momento, en el género *Staphylococcus* se incluyen 46 especies descritas, con 24 subespecies, recogidas en la base de datos cuya dirección web es la siguiente <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>². De ellas, al menos 16 especies se encuentran asociadas con humanos y pueden vivir en toda la superficie del cuerpo, si bien ciertas especies se encuentran en nichos específicos. Ejemplo de esto es *S. aureus*, que se encuentra principalmente en las fosas nasales, garganta, perineo y axilas, así como *S. epidermidis* que se ubica en la piel, *S. capitis* en la cabeza y *S. auricularis* en las orejas. También se pueden aislar miembros de este género en muchos otros hospedadores: primates, cerdos, vacas, cabras, ovejas, perros, gatos, roedores, nutrias, delfines, ballenas y aves.

Los estafilococos fueron reconocidos por Robert Koch en 1878, siendo cultivados por primera vez por Louis Pasteur en 1880. En 1884, Antón J. Rosenbach los cultivó en medios artificiales, diferenciándolos en dos especies, a las que llamó *S. aureus* y *S. albus*, en base a la pigmentación que presentaban las colonias, dorado y blanco respectivamente (Figura 2. 1).



Figura 2. 1. Dos aislados de *S. aureus* que muestran distinta coloración y que en 1884 fueron separadas, por ello, en dos especies diferentes: *S. aureus* (colonias doradas) y *S. albus* (colonias blancas).

S. aureus es la especie tipo del género *Staphylococcus*, presentando todas las características propias de dicho género. Son cocos Gram positivos, con un tamaño de 0.5-1 μm , que presentan agrupación en racimos, son inmóviles, no forman esporas, son anaerobios facultativos y, catalasa y coagulasa positivos (Figura 2. 2). Además, necesitan vitaminas y aminoácidos para su crecimiento, y son capaces de fermentar la glucosa con la consiguiente producción de ácido láctico. Toleran condiciones ambientales muy variables, pudiendo crecer a cualquier temperatura entre 6 y 46° C, con el óptimo de 30 a 37° C. Son capaces de desarrollarse en valores de pH comprendidos entre 4 y 9.8, teniendo el óptimo en la neutralidad, y de resistir hasta un 20% de NaCl en el medio. Este último aspecto permite su crecimiento en alimentos con muy baja actividad de agua (a_w), desde 0.99 hasta 0.83, siendo el valor óptimo 0.94. Es un microorganismo bastante resistente a la congelación, el calor y la desecación.

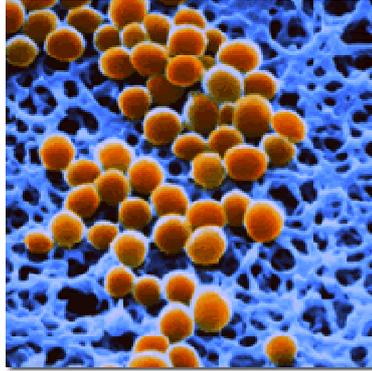


Figura 2. 2. Estado de agrupación en racimo típico de *S. aureus*.

2.1.2. Genoma

En general, se ha propuesto que el genoma de cualquier especie bacteriana comprende el genoma central, el genoma auxiliar y los genes externos al mismo. El genoma central es aquel que se encuentra presente en más del 95% de los aislados de una especie; el auxiliar, o accesorio, se encuentra de un 1 a un 95%; y los genes externos en menos de un 1% de los aislados³.

En el caso de *S. aureus*, debido a la disponibilidad de genomas secuenciados, se ha podido realizar un análisis comparativo entre los aislados clínicos y las cepas tipo, así como con cepas multirresistentes y sensibles a varios antibióticos⁴. De este análisis se puede concluir que el genoma de esta especie presenta un tamaño de 2820 Mb a 2903 Mb, conteniendo entre 2592 y 2748 secuencias codificantes de proteínas⁵⁻⁷, estando compuesto por el genoma central y los genes accesorios⁴. De estas comparaciones se ratifica que la mayor parte de las diferencias entre cepas es debida a elementos móviles, incluyendo bacteriófagos temperados, transposones, secuencias de inserción, islas de patogenicidad y plásmidos conjugativos. Siendo la identificación de estos elementos relativamente sencilla debido a que se reconocen fácilmente regiones del cromosoma características, como son los puntos calientes de variación, las terminaciones diferenciadas o la presencia de genes que parecen implicados en la transferencia horizontal.

2.1.2.1 Genoma central

Un análisis *in silico* sugiere que el genoma central presenta aproximadamente un 75% de la secuencia altamente conservada entre los diferentes aislados^{4,7}. La mayoría de los genes del genoma central se encuentran asociados al metabolismo y a otras funciones necesarias para la viabilidad de la bacteria (genes *housekeeping*), aunque también presenta genes de virulencia que no son portados por otras especies estafilococales, como las proteínas de unión a la superficie, toxinas, exoenzimas y las proteínas de la cápsula⁴.

2.1.2.2 Genoma accesorio

El genoma accesorio implica aproximadamente el 25% del genoma de cualquier *S. aureus*, y, aunque no constituyen elementos fundamentales para la supervivencia de la bacteria, son importantes, ya que normalmente codifican funciones que son requeridas en un nicho en particular, como factores de virulencia, proteínas de unión a la superficie y toxinas entre otros^{4,7}. La mayor parte de él consiste en elementos genéticos móviles que pueden transferirse horizontalmente entre cepas, hecho crucial en la plasticidad del genoma, permitiendo su adaptación a distintos ambientes. Los mecanismos teóricos de intercambio genético son tres: transformación, transducción y conjugación, aunque, hasta el momento, se ha demostrado que en la naturaleza son los dos últimos los que toman un valor significativo⁸. Además, se ha descrito un nuevo mecanismo de intercambio genético, observado también en estafilococos, denominado transferencia por cultivo mezclado o conjugación mediada por fago, del que queda mucho por entender^{9,10}. Debido a que se han encontrado elementos accesorios idénticos en distintas especies estafilococales y en distintos géneros, se sabe que los mecanismos de transmisión de los genes no sólo facilitan la transferencia intraespecífica, sino que además, también facilitan el intercambio genético interespecífico e intergenérico¹¹. Los principales elementos móviles del genoma son los siguientes:

- **Plásmidos**

Los plásmidos son moléculas de ADN circular autorreplicativas. Normalmente son encontrados uno o más plásmidos en los aislados clínicos de *S. aureus*¹². Muchos

de los plásmidos de estafilococos se clasifican en una de las tres clases principales de plásmidos, que se expondrán a continuación, en base a su organización físico-genética y sus características funcionales¹³. No obstante, existe una amplia diversidad, ya que la familia de plásmidos pSK639 podría ser considerada como una cuarta clase¹⁴, además de que se han descrito otros plásmidos que no encajan en ninguno de estos grupos^{13,15,16}. Las tres clases principales de plásmidos son:

- *Plásmidos pequeños multicopia*. Normalmente tienen un tamaño menor de 5 kb, siendo muy raro encontrar en ellos elementos transponibles¹³, y se replican mediante el mecanismo del círculo rodante¹⁷. Se encuentran entre 10 y 60 copias/célula y normalmente son enigmáticos o portan un único gen de resistencia, aunque se han descrito algunos casos en los que se han detectado dos de estos determinantes¹². Plásmidos de esta familia se han identificado en diferentes especies estafilococales y otros géneros bacterianos como *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, indicando su transmisión horizontal. Los plásmidos de la familia pSK639, citada previamente, se pueden considerar pertenecientes a este grupo por su tamaño y características, sin embargo, emplean una región de replicación similar a la replicación en *theta*¹⁸ y porta secuencias de inserción o ISs (del inglés *Insertion Sequences*)¹⁴, por lo que han sido propuestos como una clase aparte.
- *Plásmidos de multiresistencia*. Tienen un tamaño de 15 a 30 kb, encontrándose normalmente de 4 a 6 copias/célula¹². Codifican varios genes de resistencia y frecuentemente se asocian con elementos transponibles^{8,19}. Debido a su gran tamaño, se cree que estos plásmidos se replican mediante el modo *theta*. Se han descrito dos familias dentro de esta clase: la de resistencia a β -lactamasas y metales pesados, muy frecuentemente detectada desde la década de 1960; y la del pSK1, identificada por primera vez en *S. aureus* y en estafilococos coagulasa negativos en Australia en la década de 1980¹⁹.
- *Plásmidos conjugativos*. Con un tamaño mayor de 30 kb, también se encuentran en bajo número de copias por célula. Son los mayores plásmidos estafilococales multiresistentes descritos, y son aquellos que codifican su propia transferencia conjugativa^{12,19}. La familia más estudiada de este tipo de plásmidos incluye el pSK41^{20,21} y el pGO1²², ambos descritos en *S. aureus*. Esta conjugación del

plásmido pSK41 ocurre sólo en superficies sólidas y con una eficiencia de 10^{-5} - 10^{-7} transconjugantes por célula donadora²³. En general, estos plásmidos se caracterizan por poseer múltiples copias de la IS257 dispuestas en las dos orientaciones.

- ***Transposones y secuencias de inserción***

Las ISs han demostrado jugar un rol sutil en la expresión fenotípica y en la evolución del genoma. Se pueden encontrar de forma independiente, pero frecuentemente se sitúan por parejas, constituyendo un transposón completo²⁴. Las ISs se localizan en el genoma central, pudiendo provocar cambios en la expresión de los genes adyacentes. Por ejemplo, pueden inactivar genes por su inserción directa o por el efecto polar en la transcripción de los genes cercanos^{25,26}. Por el contrario, también pueden producir la activación de genes que se encuentren alrededor, fundamentalmente actuando como promotores o constituyendo un promotor híbrido con el promotor nativo del gen en particular²⁷. Ejemplos de ISs son la IS256 e IS257, las cuales en los transposones Tn4001 y Tn4003 constituyen promotores híbridos para el operón de resistencia a aminoglicósidos y a trimetoprima, respectivamente¹⁹.

Los transposones codifican fundamentalmente resistencias a antimicrobianos. Los más pequeños normalmente se encuentran en múltiples copias en el cromosoma de la bacteria o en elementos móviles, como plásmidos y casetes cromosómicos estafilococales. Este grupo incluye el Tn552, el transposón de la β -lactamasa. Su integración parece estar restringida a un número limitado de sitios de inserción del cromosoma y de plásmidos¹⁹, pero a pesar de esto, se considera la fuente de todos los genes estafilococales de β -lactamasas. En comparación, los transposones de mayor tamaño, > 18 kb, se encuentran en una única copia y codifican resistencias como la tetraciclina³⁰, trimetoprima²⁹, aminoglicósidos^{24,31} o vancomicina³². El transposón Tn4001 y los elementos relacionados se creen responsables de la emergencia de las resistencias a aminoglucósidos, gentamicina, tobramicina y kanamicina en estafilococos, donde se ha encontrado insertado, tanto en el cromosoma, como en plásmidos multirresistentes, en aislados clínicos de *S. aureus* y otros estafilococos coagulasa negativos^{10,19,33}.

- ***Casetes Cromosómicos Estafilococales (SCCs)***

Son segmentos de ADN de 20 a 70 kb que se encuentran incluidos en el cromosoma de algunos aislados de *S. aureus*, pero que no pertenecen al genoma propio de la bacteria. El principal casete cromosómico descrito es el que se encuentra asociado al elemento *mec*, constituyendo el SCC*mec*³⁴. Este elemento está presente en las cepas resistentes a meticilina, por contener el gen *mecA*, que codifica resistencia a dicho antibiótico. Además, se encuentran dos elementos reguladores, *mecI* y *mecR*, que se localizan corriente arriba de *mecA*, y se transcriben divergentemente a él. La región *mec* parece actuar como punto caliente para la inserción adicional de determinantes de resistencias antimicrobianas, a menudo en asociación con elementos transponibles³⁵, dando lugar a distintos tipos y subtipos de este elemento, explicados en el capítulo 1, y en los que se profundizará posteriormente. En *S. aureus* existen además otros casetes que no se encuentran asociados a la región *mec*. Así, por ejemplo, se ha descrito el SCC₄₇₆ que codifica la resistencia al ácido fusídico⁵, el SCC*mercury* que codifica la resistencia al cloruro de mercurio³⁶, y el SCC*cap1*, el cual codifica el polisacárido 1 de la cápsula, confiriéndole a la bacteria resistencia a la fagocitosis³⁷. El mecanismo de transmisión de estos casetes cromosómicos aún no se conoce con exactitud.

- ***Bacteriófagos***

Los bacteriófagos, o virus de bacterias, parece que tienen un gran impacto en la evolución y diversidad bacteriana. La mayoría de estos fagos descritos en *S. aureus*, son miembros de la familia *Siphoviridae*, y, a pesar de que tienen la habilidad para producir la lisis de la bacteria tras la infección, normalmente establecen relaciones de largo plazo con el hospedador, integrándose en su genoma^{38,39}. Muchos aislados clínicos de *S. aureus* contienen múltiples profagos¹², que podemos clasificar en 5 familias en base a la homología encontrada en el gen que codifica para la integrasa, la cual dicta el sitio de inserción. Todos los genomas secuenciados contienen al menos un profago^{5,40,41} y ninguna cepa parece tener más de un fago de cada familia, debido posiblemente a la competición por los sitios de inserción⁴. Estos bacteriófagos portan genes importantes en la

patogenicidad de *S. aureus*, como la estafilokinasa, que es un importante activador del plasminógeno⁶, el inhibidor estafilococal del complemento, las proteínas inhibidoras de la quimiotaxis^{42,43} o la leukocidina de Panton-Valentine⁴⁴.

- ***Islas de patogenicidad***

Son segmentos de ADN de entre 14 y 17 kb integrados en el cromosoma de la bacteria, que, comúnmente codifican superantígenos. En su transmisión parece que juegan un papel importante los bacteriófagos que las ayudan en el movimiento, pero aún así, presentan una frecuencia de transmisión alta⁴⁵. Las islas de patogenicidad de *S. aureus*, o SaPIs (del inglés *S. aureus Pathogenicity Islands*), incluyen genes que codifican para la toxina 1 del síndrome del shock tóxico y las enterotoxinas B, C, K, L y M, llegando a portar aproximadamente la mitad de las toxinas o factores de virulencia de *S. aureus*⁴⁶. Además codifican una integrasa tipo fágica, la cual media su inserción en sitios específicos del cromosoma bacteriano.

- ***Islas genómicas***

Se trata de islas extremadamente estables que han sido detectadas en todos los aislados secuenciados, en la misma localización y con algunos genes altamente conservados. Sin embargo, existe una marcada variedad entre cepas, llevando cada una de ellas su propio número y variantes de genes que codifican para superantígenos, bacteriocinas y enterotoxinas, entre otros^{5,40,46}. En todos los genomas secuenciados de *S. aureus* se han encontrado tres familias de islas genómicas: *vSaa*, *vSaβ*, *vSaγ*^{4,40,46}. Debido a que todas se encuentran flanqueadas corriente arriba por el gen truncado de la transposasa y a su contenido en G+C distinto al del genoma central, se ha postulado que se han adquirido por transferencia génica horizontal⁴⁷.

2.1.3. Proceso de infección por *Staphylococcus aureus*

S. aureus es tanto un microorganismo comensal como patógeno. Se cree que se localiza principalmente colonizando la fosa nasal anterior⁴⁸⁻⁵¹. En un estudio realizado en 1997, se observó que esta bacteria se encuentra colonizando las fosas nasales asintómicamente de manera persistente a un 20% de la población, de manera intermitente a un 60%, y el 20% restante son no portadores, que de forma muy rara portarán la bacteria⁵⁰. No obstante, *S. aureus* también se puede aislar de axilas, manos e ingles, y más recientemente se ha comprobado que la garganta también puede ser un lugar de colonización para *S. aureus*^{52,53} (Figura 2. 3).

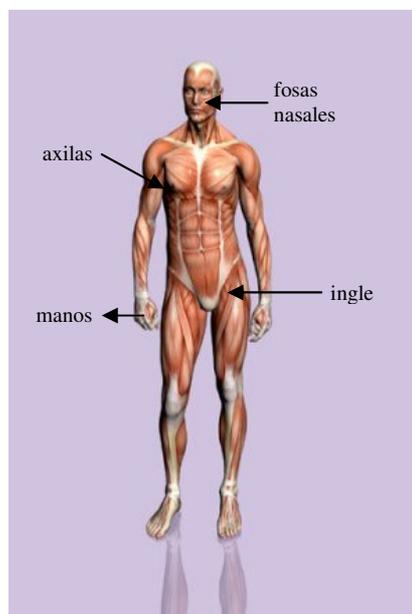


Figura 2. 3. Localización en el cuerpo humano de los lugares frecuentes de colonización por *S. aureus*.

La duración de la colonización asintomática varía en los distintos estudios publicados, aunque, en cualquier caso es elevada. Así, por ejemplo, en un ensayo de vida media de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) en portadores nasales, se observó que ésta era de 40 meses⁵⁴, lo que quedó apoyado por otro estudio en el cual demostraron que la colonización podía durar 24 meses o más⁵⁵. Posteriormente, en otra publicación, el tiempo medio necesario fue de 8 meses, llegando a un máximo de 3.3 años, resultado llamativo, ya que en este caso el grupo de estudio participó en un proceso de descolonización rutinaria⁵⁶.

Además, en este último, fueron detectados factores de riesgo para la persistencia en la colonización, como el uso de antibióticos, la presencia de una infección de piel y tejido blando, la presencia de catéter, y que el paciente se esté sometiendo a hemodiálisis⁵⁶.

Como hemos visto en el capítulo 1, la colonización es importante puesto que supone un reservorio a partir del cual la bacteria puede introducirse en el organismo y causar patología cuando las defensas del hospedador se ven comprometidas^{50,57-62}. Esto fue demostrado en un estudio sobre bacteriemia, cuyos aislados recuperados de sangre fueron idénticos a los aislados nasales en el 82% de los pacientes⁶³. No obstante, la magnitud de este proceso aún no está bien estudiada.

Se cree además, que la colonización ayuda a que *S. aureus* sea transmitido entre individuos, facilitando con ello su dispersión. En este fenómeno parece que está implicado el contacto entre hospedadores y la habilidad de la bacteria, tanto para adherirse a las células, como para evadir la respuesta inmune del organismo hospedador⁵⁸. Sin embargo, la base de esta colonización es compleja, y no está entendida completamente.

Una vez que *S. aureus* deja de colonizar asintóticamente y pasa a producir una infección, puede causar un amplio rango de enfermedades, desde infecciones leves, como orzuelos y forúnculos, hasta otras más complejas, siendo especialmente importantes los casos de infecciones de piel y tejidos blandos o SSTIs, (del inglés *Skin and Soft Tissue Infections*), queratitis, infecciones endovasculares, neumonía, artritis séptica, endocarditis, osteomielitis y sepsis^{64,65}. La base de este cuadro de enfermedades es multifactorial y depende en gran medida de la susceptibilidad del hospedador, pero, sin duda, la heterogeneidad de *S. aureus* juega un papel importante en este proceso. Existen numerosos factores de virulencia, genes responsables de la adaptación al hospedador y toxinas, localizados en elementos genéticos móviles, que influyen de forma determinante en dichos procesos infecciosos^{4,5,40,41,46,66-70}. Estos factores se pueden dividir en tres clases:

1. Proteínas de superficie, o MSCRAMMs (del inglés *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), que median la adherencia a los tejidos del hospedador. Estas proteínas producidas durante la fase de crecimiento logarítmico, se unen a moléculas como el colágeno, la fibronectina o el fibrinógeno, y juegan un papel muy importante en el inicio de las infecciones endovasculares, de hueso y articulaciones, y de prótesis⁷¹. El caso concreto de la proteína de unión a la

fibronectina, se ha descrito que facilita la internalización de la bacteria en las células epiteliales y endoteliales⁷², lo que les permite también escapar de las defensas⁷³.

2. Toxinas secretadas durante la fase estacionaria que pueden atacar las células del hospedador a nivel local y los elementos estructurales de diversos tejidos y órganos, cumpliendo la función de expansión de la infección (Figura 2. 4). La proteína A, por ejemplo, se une a la fracción Fc de las inmunoglobulinas⁷⁴, y como consecuencia previene la opsonización. A su vez, *S. aureus* secreta una proteína inhibidora de la quimiotaxis o de adherencia extracelular, la cual interfiere en la extravasación de los neutrófilos y en la quimiotaxis al sitio de infección. Las leukocidinas producidas provocan la destrucción de los leucocitos mediante la formación de poros en la membrana⁷⁵.

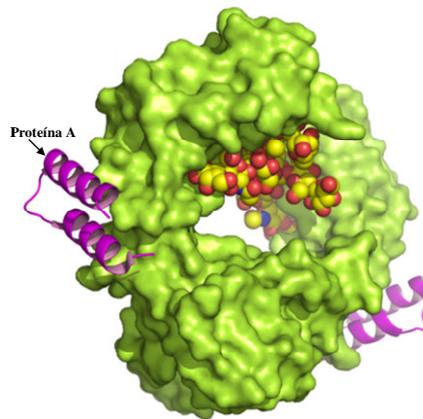


Figura 2. 4. Representación de la unión de la proteína A a la región Fc de las inmunoglobulinas⁷⁴.

3. Componentes de la pared celular, que juegan un papel importante en el shock séptico, induciendo una respuesta inmune excesiva y perjudicial para el hospedador. Incluidos en este grupo se encuentran el polisacárido de la cápsula, que constituye su principal defensa antifagocítica⁷⁶, y el peptidoglicano de la pared celular. Además, recientemente se ha identificado el ácido teicoico de la pared celular como elemento fundamental en la patogénesis de *S. aureus* en la queratitis ocular⁶⁵.

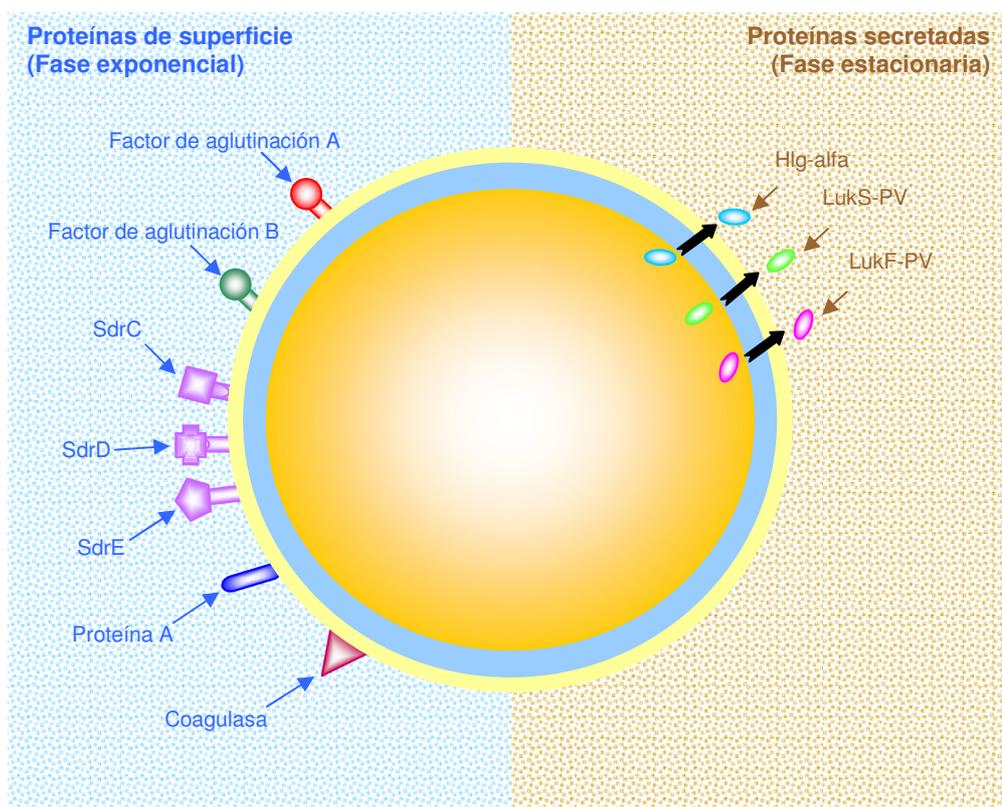


Figura 2. 5 Representación esquemática de algunos de los diferentes factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de *S. aureus*.

En la regulación de todos estos factores, el gen accesorio accesorio regulador o *agr*, (del inglés *accessory gene regulator*) juega un papel muy importante, ya que constituye un sistema de autoinducción o “*quorum-sensing*”^{45,77}. Este sistema *agr*, por tanto, supone una comunicación célula a célula, que le permite a *S. aureus* causar la variedad de infecciones que produce, ocupando numerosos nichos dentro del hospedador. Así, por ejemplo, este sistema, *in vitro*, disminuye la expresión de varias proteínas de superficie e incrementa la de muchos factores de virulencia secretados durante la transición de la fase de crecimiento tardía a la estacionaria^{78,79}. La expresión de *agr* también parece que está implicada en la invasión y apoptosis de las células epiteliales⁸⁰. Además, en un estudio realizado en conejos se observó una disminución de la virulencia en mutantes para ese gen, mostrando con ello su implicación directa en la patogénesis de la bacteria⁸¹.

En general, como hemos visto, *S. aureus* posee múltiples mecanismos para producir infecciones y evadir las defensas del hospedador, siendo, por tanto, muy importantes las labores de investigación cuyo objetivo principal es el conocimiento y bloqueo de estos mecanismos. Sin embargo, no todas las cepas de *S. aureus* son iguales en este sentido, incluso la distribución de algunos factores de virulencia está relacionada con el tipo clonal al que pertenece el aislado⁹³. Por este motivo, es necesario conocer y diferenciar las distintas cepas antes las cuales nos encontramos, para de ese modo, saber exactamente a qué resistencias, toxinas y demás factores, nos enfrentamos.

2.1.4. Evolución de *Staphylococcus aureus*

2.1.4.1 Adquisición de resistencias

S. aureus es una bacteria que ha ido evolucionando y adquiriendo resistencias a diferentes antibióticos, lo que le ha permitido sobrevivir a los diferentes tratamientos a los que se ha visto sometida a lo largo de los años.

Antes de la introducción de los antibióticos, el ratio de mortalidad por bacteriemias causadas por *S. aureus* era de aproximadamente el 70%. Este porcentaje disminuyó a un 25% después de la introducción de la penicilina. Sin embargo, desde la aparición de cepas resistentes a este antibiótico, el ratio de mortalidad a vuelto a aumentar hasta un 45%⁹⁴. En 1944 fue publicada, por primera vez, la descripción de cepas productoras de penicilasa o β -lactamasa⁹⁵. La β -lactamasa, que hidroliza el anillo β -lactámico inactivando el antibiótico, está codificada por el gen *blaZ*^{96,97}. Además de su localización en el transposón Tn552, como se expuso anteriormente, también se ha descrito en plásmidos y en el cromosoma^{96,98}. Todas las primeras cepas productoras de penicilasa fueron aisladas de pacientes hospitalizados⁹⁹. Sin embargo, la penicilina continuó siendo recomendada como un efectivo agente anti-estafilococal hasta la década de los 70. A finales de esta década, un 90% de estos aislados eran resistentes a la penicilina, y este porcentaje se ha mantenido desde entonces⁹⁶.

La meticilina (anteriormente denominada celbenina) fue el primer derivado de la penicilina diseñado específicamente para resistir a la penicilasa. Sin embargo, fue introducida

en 1959-1960, y en sólo un año se describieron en Reino Unido aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina o SARM¹⁰⁰.

La eliminación de la más grande y útil clase de antibióticos (los β -lactámicos), por los mecanismos basados en el casete *mec*, supuso un punto de inflexión en la historia de los antimicrobianos. Fue, además, responsable del comienzo del uso en todo el mundo de los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), marcando la llegada de SARM resistentes a ellos. En 1996 se describieron por primera vez en Japón SARM con resistencia intermedia a la vancomicina (SAIV)¹⁰¹, y, posteriormente, también emergieron cepas resistentes a altos niveles a dicho antibiótico (SARV)¹⁰², ambas condiciones extendidas actualmente a numerosos países¹⁰³⁻¹⁰⁸. El mecanismo de resistencia intermedia a la vancomicina continúa sin ser completamente conocido¹⁰⁹, mientras que la resistencia a altos niveles de este antibiótico está mediada por el gen *vanA*, y ha sido ampliamente estudiada^{32,110}. El gen *vanA* se localiza en el transposón Tn1546 localizado dentro de un plásmido conjugativo^{111,112}, y se expresa únicamente en presencia de la vancomicina, mediante un proceso de transducción de señal. Además, dos genes pertenecientes al grupo del *vanA*, *vanY* y *vanZ*, codifican una proteína accesoria que podría jugar un papel en la resistencia a la teicoplanina^{113,114}. Esto dio paso a la aparición de SARM resistentes a múltiples drogas, existiendo actualmente pocos antimicrobianos efectivos contra SARM¹¹⁵. Además, muchos de los antibióticos disponibles tienen múltiples limitaciones y el desarrollo de nuevas clases de antibióticos avanza lentamente¹¹⁶⁻¹¹⁸. Todo esto ha disparado la alarma frente a la posibilidad de encontrarnos ante infecciones “intratables”^{102,119}.

2.1.4.1.1 Resistencia a la meticilina

Los antibióticos β -lactámicos se unen a las denominadas proteínas de unión a la penicilina (PBP) de la pared celular, bloqueando la síntesis del peptidoglicano de la pared, y conduciendo a la muerte de la bacteria. La resistencia a la meticilina es conferida por el gen *mecA*, que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), una transpeptidasa de la pared celular de 78 kDa. Dicha proteína no presenta afinidad a los antibióticos β -lactámicos, permitiendo que continúe la síntesis de la pared celular (Figura 2. 6)¹²⁰.

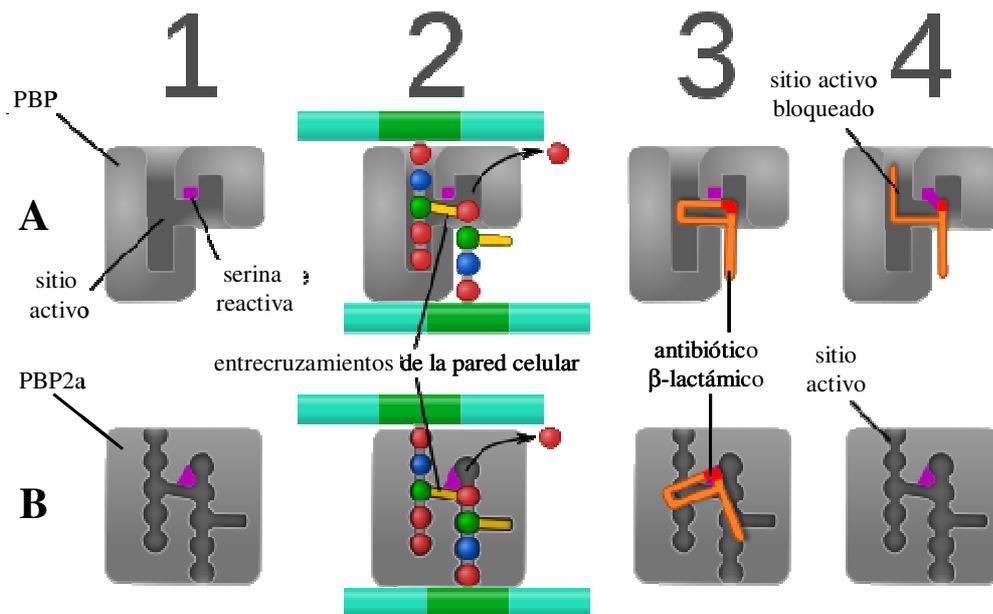


Figura 2. 6. A. Interrupción de la síntesis de la pared celular de *S. aureus* mediante un antibiótico β-lactámico, el cual se une a la PBP, bloqueando su sitio activo. B. Resistencia a los antibióticos β-lactámicos en cepas SARM mediante la producción de la PBP2a, sin afinidad por dicho grupo de antimicrobianos.

Como ha sido explicado en el capítulo 1, acompañando al gen *mecA*, integrado siempre en la pauta de lectura abierta con función desconocida, denominada *orfX*¹²¹, se encuentran los genes *mecI* y *mecRI*, ambos reguladores de su expresión, que se transcriben divergentemente a él. En ausencia de β-lactámicos la proteína MecI (producto del gen *mecI*) reprime la transcripción de *mecA* y *mecRI*. En presencia de β-lactámicos, MecRI es roto autocatalíticamente, quedando activo el dominio metaloproteasa, localizado en su parte citoplasmática. Este dominio se une al operador de *mecA*, activando su transcripción, produciendo finalmente PBP2a¹²².

El gen *mecA* y sus dos genes reguladores constituyen el complejo *mec*, habiendo evolucionado distintos complejos. El complejo B expresa el gen *mecA* de manera constitutiva, mientras que el complejo A expresa el gen sólo en presencia de β-lactámicos. También se han descrito los complejos C y D¹²⁴, aunque este último ha sido detectado exclusivamente en estafilococos coagulasa negativos. Además, en el SCC*mec* está presente el complejo *ccr* (del inglés *chromosome cassette recombinase*), responsable de su inserción/escisión del cromosoma bacteriano, compuesto por la combinación de los genes *ccrA* y *ccrB*, o por el gen *ccrC*¹²⁵. Las restantes zonas del casete son las denominadas regiones J (J1-J3), que constituyen regiones no esenciales del elemento, pero que pueden aportar otros genes de

resistencia a antibióticos, transposones (Tn4001 y/o Tn554) y/o plásmidos (pUB110, pI258 y pT181). El plásmido pUB110 porta el gen *ant(4')*, responsable de la resistencia a la kanamicina, tobramicina y bleomicina, mientras que el pI258 codifica resistencia a las penicilinas y metales pesados, y el pT181 codifica la resistencia a la tetraciclina³⁴. El transposón Tn4001 codifica resistencia a la gentamicina, tobramicina y kanamicina¹⁰, mientras que el Tn554 porta el gen *ermA* responsable de la resistencia inducible a los macrólidos, lincosamida y estreptogramina¹²⁶. La organización estructural del SCCmec se puede representar de forma resumida como J1-*ccr*-J2-*mec*-J3. Las combinaciones de los distintos tipos de *ccr* y del complejo *mec* distinguen los tipos de SCCmec, mientras que las variaciones en las regiones J dentro de la misma combinación *ccr-mec* son usadas para definir los subtipos^{40,127-129}. Hasta el momento, se han descrito ocho estructuras principales de SCCmec (I-VIII) para SARM, aunque se han ido descubriendo nuevos casetes y nuevas variantes de ellos¹³⁰ (Figura 2. 7).

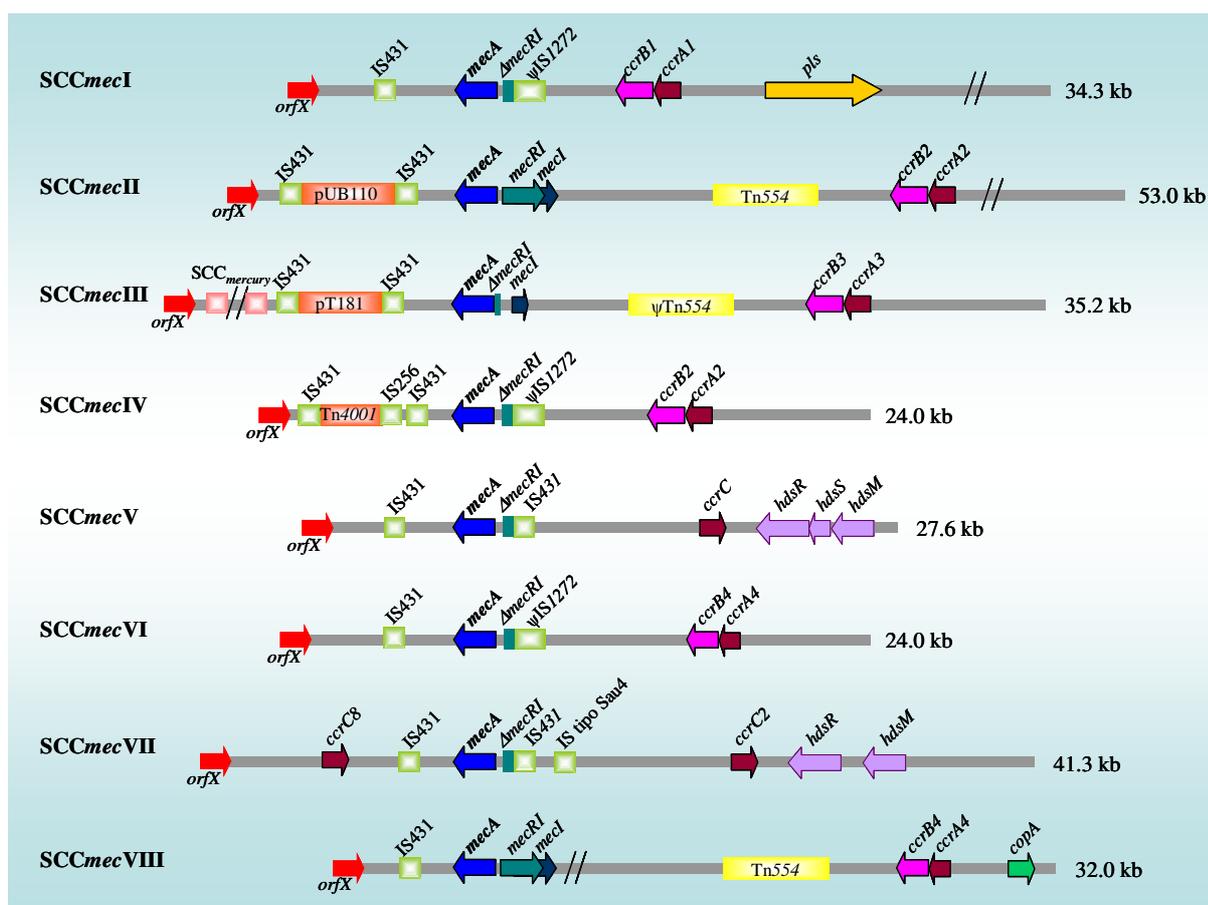


Figura 2. 7. Representación esquemática de los principales tipos de SCCmec descritos hasta el momento.

Los casetes del I-III son los de mayor tamaño y se cree que probablemente hayan sido transferidos a *S. aureus* por especies estafilococales comensales en pocas ocasiones¹²⁹. Los tipos SCC*mec*IV y V son los más pequeños de tamaño, y, al contrario que los anteriores, se cree que han sido transferidos a SASM (*S. aureus* susceptible a meticilina) frecuentemente, resultando en la emergencia de nuevas cepas SARM portando estos casetes¹³¹⁻¹³³. Un estudio sugirió que el SCC*mec*IV ha sido transferido a una cepa SASM más de 20 veces¹³⁴. En otro estudio realizado en Chicago de 2004 a 2005 observaron que los niños son más susceptibles a padecer infecciones producidas por SARM portadores del SCC*mec*IV^{135,136}. Dato que también se observó en otro realizado en un hospital del Sur de Korea, en el cual observaron que los niños tenían un 68% de probabilidad de sufrir una infección por un SARM portador del SCC*mec*IV, frente a un 12% que presentaron los adultos¹³⁷. Estos estudios sugieren que los niños son más susceptibles o están especialmente expuestos a estas cepas, pero definitivamente la razón de este suceso continúa siendo desconocida. El SCC*mec*V es más pequeño y presumiblemente con movilidad similar. A diferencia de los anteriores casetes, cuya distribución está extendida mundialmente, este ha sido detectado principalmente en Australia¹³⁸ y Taiwan¹³⁹⁻¹⁴¹, siendo su presencia menos frecuente en Europa y Estados Unidos¹⁴²⁻¹⁴⁴. En 2001 se describió un casete con dos nuevas variantes de los genes *ccrA* y *ccrB*, lo que unido a su importancia epidemiológica, hizo que se constituyera como el SCC*mec* tipo VI^{128,145}. Los tipos de SCC*mec* VII y VIII, son los más recientemente descritos, habiéndose descrito en Suecia¹⁴⁶ y Canadá¹⁴⁷, respectivamente.

La aparición de SARM representa una historia evolutiva en múltiples fases, partiendo de la fuente original del gen de resistencia *mecA*, seguido de su movilización y asociación con el SCC, que parece tener su propia evolución independiente. Posteriormente, estos casetes portando el gen *mecA* se introdujeron en cepas susceptibles de *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus*, quizá en asociación con bacteriófagos. En algunos de estos casos, la adquisición del SCC*mec* permitió la emergencia de un grupo de *S. aureus* con resistencia a meticilina. Se postula que este casete procede de otra especie desconocida o de estafilococos coagulasa negativos, como *S. epidermidis*¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, ya que también se han descrito en esta especie^{148,149}. En un estudio realizado en 2001, se recuperó de muestras de un neonato, un aislado SASM y su isogénico SARM, presentando este último el mismo SCC*mec* que portó un aislado *S. epidermidis* recuperado del mismo niño, lo que sugiere la existencia de transferencia horizontal *in vivo* entre ambas especies. Actualmente se cree que

Staphylococcus sciuri portaba el ancestro de PBP2a, ya que una PBP encontrada en esta especie presentó un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos con ésta. Estas cepas eran todas susceptibles de la meticilina, pero se volvieron resistentes en presencia de este antibiótico por un incremento en la transcripción del homólogo del gen *mecA* y una mutación puntual en el promotor. Además, una cepa SASM se convirtió en SARM al introducirse este gen homólogo de *mecA* procedente de *S. sciuri*¹⁵¹.

La primera cepa SARM descrita en Inglaterra en 1961, fue denominada el clon arcaico y portaba el SCC*mec* tipo I. Durante la década de los 60, los SARM fueron descritos en Europa, y a partir de los años 70 un subgrupo de ellos se diseminó globalmente como clones SARM epidémicos (Figura 2. 5). Existen dos teorías opuestas sobre la relación entre los primeros SARM y los actuales. La primera, la teoría del clon único, sugiere que todas los clones SARM proceden de un único ancestro común y que el SCC*mec* fue introducido una única vez¹⁵²; mientras que la segunda, y la más aceptada, denominada teoría de múltiples clones, sugiere que el casete se ha introducido varias veces en linajes genéticos diferentes (Figura 2. 8)^{66,153-155}. Enright *et al.*, en un estudio entre 1961 y 1999, donde incluyeron aislados SASM y SARM de 20 países, encontraron 5 complejos clonales (CC5, 8, 22, 30 y 45), observando que las cepas pertenecientes al mismo tipo de secuencia o ST (del inglés *sequence type*) presentaron también el mismo tipo de SCC*mec*, lo que apoya la teoría de los múltiples clones¹⁵⁴.

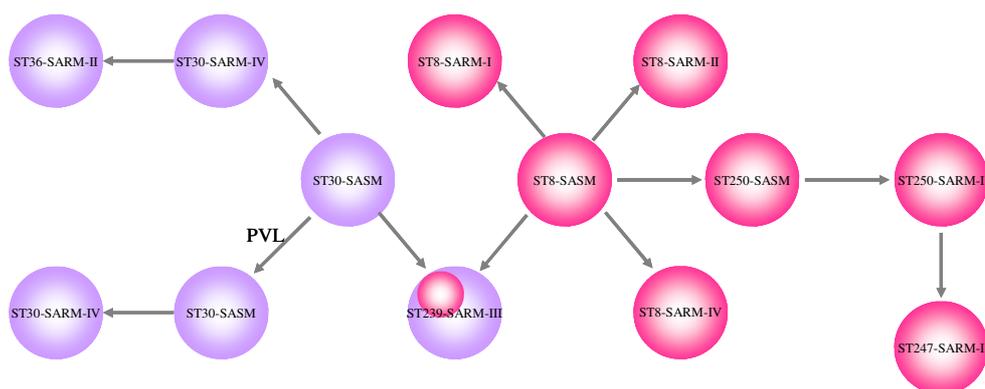


Figura 2. 8 Representación propuesta por Deurenberg y Stobberingh sobre el origen evolutivo de algunos de los mayores clones SARM descritos, así como su posible adquisición de la toxina de Pantón-Valentine o PVL¹⁵⁶. Las flechas indican adquisición o cambio del tipo de SCC*mec*, un cambio de ST o la adquisición de los genes *pvl*. Los círculos de color malva indican los clones pertenecientes al CC30, mientras que los rosa muestran los pertenecientes al CC8. La cepa ST238-SARM-III, presentada con ambos colores, ha evolucionado adquiriendo un fragmento cromosómico de 557 pb del ST30 en un linaje ST8^{8,154,157}.

Los SARM se han convertido en la causa principal de infecciones adquiridas en el hospital (SARM-AH). La mayoría de estas infecciones han sido debidas a varios clones internacionalmente diseminados, a los que llamamos clones pandémicos. Estos clones no solo han ido convirtiéndose en multirresistentes a antibióticos, sino que además se postula un incremento de la virulencia debido a la mejora en la transmisibilidad y habilidad para la colonización.

2.1.4.1.2 Resistencia a la mupirocina

La mupirocina, o ácido pseudomónico, es un antibiótico tópico que se emplea desde 1985, frecuentemente como descolonizador de las fosas nasales o zonas de la piel que van a someterse a operación, así como en la terapia del impétigo, o, simplemente, como profilaxis. Es un antibiótico natural, producido por *Pseudomonas fluorescens*, que se une a la isoleucil-ARNt sintetasa, inhibiendo la síntesis proteica, ya que no se incorpora la isoleucina a la cadena polipeptídica en formación¹⁵⁸.

En la resistencia a la mupirocina en *S. aureus*, detectada desde 1987¹⁵⁹, se han propuesto tres niveles. La primera es la susceptibilidad a la mupirocina a la concentración mínima inhibitoria (CMI) $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, la segunda es la de bajo nivel de resistencia, con CMI de 8-256 $\mu\text{g/ml}$, y, finalmente, resistencia a altos niveles de mupirocina con CMI $\geq 512 \mu\text{g/ml}$ ¹⁶⁰, incluso superiores a 1024 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁶¹. La resistencia con valores de 128 o 256 $\mu\text{g/ml}$ es poco común. La resistencia a bajos niveles de mupirocina es debida a mutaciones puntuales en el gen *ileS* que se encuentra en el cromosoma de la bacteria, produciendo cambios en la isoleucil-ARNt sintetasa nativa¹⁵²; mientras que la resistencia a altos niveles de mupirocina está asociada con la presencia del gen *ileS2*, también denominado *mupA*, que se encuentra en un plásmido conjugativo. Aunque realizan la misma función, la identidad entre ambas proteínas es solo del 30%. El *ileS2* codifica para una isoleucil-ARNt sintetasa diferente que no tiene afinidad por la mupirocina^{161,163}, por lo que su presencia permite que continúe la síntesis proteica. No obstante, se han encontrado algunas excepciones a esta clasificación. De ese modo, aislados portadores del gen *ileS2* han mostrado resistencia a bajos niveles de mupirocina, viéndose que estos aislados portaban este gen en el cromosoma de la bacteria¹⁶⁴.

También se han descrito aislados susceptibles a la mupirocina, pero portadores del *ileS2*, siendo debido, en este caso, a una mutación que produce un cambio en la pauta de lectura del gen, inactivando su producto¹⁶⁵. Y, finalmente, en algunos aislados que muestran resistencia a altos niveles de mupirocina no ha sido posible encontrar el gen *ileS2*, por lo que se cree que debe existir otro mecanismo aún desconocido que les confiera dicha resistencia a estas cepas¹⁶⁶. De hecho, este mecanismo puede que haya sido descubierto recientemente, ya que se ha encontrado un nuevo gen, el *mupB*, también responsable de la resistencia a altas concentraciones de mupirocina¹⁶⁷.

El gen *ileS2* se localiza normalmente en plásmidos conjugativos, facilitando así su dispersión^{168,169}. En ellos, se encuentra flanqueado por ISs, lo que debe propiciar su movimiento entre plásmidos por recombinación^{169,170}. Se ha descrito una gran variabilidad de estos plásmidos portadores del *ileS2* en cuanto a tamaño, patrones de restricción y frecuencia de recombinación¹⁶⁹⁻¹⁷³. En general, estos plásmidos conjugativos portan multiresistencia, y pertenecen a la familia de los mayores plásmidos estafilococales, de la cual, el denominado pSK41, es el prototipo²⁰. Los plásmidos de esta familia muestran un alto grado de similitud, tanto en su secuencia, como en su estructura; por lo que en ellos se puede reconocer un “esqueleto”, en el cual se han integrado distintos genes de resistencia, a menudo mediada por la inserción de la IS257¹⁷⁴. De ese modo, en el esqueleto podemos identificar la Región 1, que abarca los genes implicados en la replicación y el mantenimiento del plásmido; y la Región *tra*, considerada la región de transferencia^{20,175,176}. Entre ambas regiones se encuentran determinantes de resistencia para otros agentes antimicrobianos no β -lactámicos, como macrólidos, tetraciclina, gentamicina y trimetropin¹⁷⁷, lo cual sugiere que el uso de la mupirocina podría seleccionar resistencias a otras drogas. Pocos representantes de esta familia, portadores del *ileS2*, han sido secuenciados y depositados en la base de datos del NCBI. Dos de ellos, los plásmidos pUSA03 (referencia en el *GenBank* NC_007792)⁶ y pV030-8 (referencia en el *GenBank* NC_010279), de 37136 y 39041 pb respectivamente, han sido secuenciados completamente, mientras que el pGO400, ha sido parcialmente caracterizado¹⁶⁹. En un estudio realizado en nuestro hospital, fueron detectados 9 tipos de plásmidos portadores del gen *ileS2*, los cuales podían agruparse en 4 grupos estructurales¹⁷⁸. Entre estos plásmidos, el denominado pMUP9 o pPR9, de 41715 pb, fue seleccionado para su completa secuenciación recientemente (referencia en el *GenBank* NC_013653)¹⁷⁹. Las secuencias de todos estos plásmidos portadores del gen *ileS2* presentan más de un 90% de

identidad en los genes pertenecientes a su esqueleto. Con respecto al gen *ileS2*, en todos los plásmidos secuenciados se encuentra flanqueado por la IS257, aunque en cada uno presenta una posición única. Algo llamativo del pPR9, es que es el único plásmido en el que la IS257 localizada corriente arriba del gen *ileS2* se encuentra invertida. Las distintas reorganizaciones de la IS257 localizada corriente arriba del gen *ileS2*, han planteado la posibilidad de que constituyan promotores híbridos que conduzcan la transcripción de dicho gen en cada plásmido, lo que tendría consecuencias en su expresión. Por ejemplo, esto sucede en el pGO400¹⁸⁰, en el cual se ha propuesto un potencial promotor híbrido que encaja mejor con la secuencia consenso convencional que el promotor predicho inicialmente¹⁸¹. El pMUP9 también posee un potencial promotor híbrido, si bien, éste no encaja de forma óptima con la secuencia consenso.

En un estudio realizado en el año 2009, observaron que el gen *ileS2* se expresa de forma constitutiva, no detectando cambios de expresión en presencia de la mupirocina. Cuando se cultivó una cepa de *S. aureus* resistente a altas concentraciones de mupirocina en presencia de este antibiótico, se observó un crecimiento más lento, que las que crecen sin este agente, probablemente producto de la inhibición de la isoleucil-ARNt sintetasa nativa codificada por el gen *ileS*. Sin embargo, a partir de las 4 horas, todos los cultivos alcanzaron su fase de crecimiento exponencial¹⁸². No obstante, se desconoce si los niveles de expresión del gen *ileS2* son iguales en todas las cepas portadoras del mismo, o si por el contrario, tal y como se propuso anteriormente, dependen del ambiente plasmídico en el que se encuentren, especialmente por la influencia de la IS257.

A nivel clínico, pocos centros determinan rutinariamente la resistencia a la mupirocina, pero se ha demostrado que cuando este antibiótico se utiliza en regímenes de descolonización, la resistencia a él emerge rápidamente¹⁶⁸. De hecho, cada vez son más los aislados SARM resistentes a altas concentraciones de mupirocina descritos, fundamentalmente en el ambiente hospitalario, incluido el Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC)¹⁸³. Por lo tanto, no solo debe restringirse el uso de este antibiótico, sino que se debe considerar imprescindible la determinación rutinaria de dicha resistencia para el control de las infecciones producidas por SARM.

2.1.4.2 Emergencia de SARM en la comunidad

Hasta la década de los 90, se creía que los SARM estaban relegados al ambiente hospitalario. Sin embargo, entre 1989 y 1991 se describió una infección por SARM en una población en Estados Unidos en la que no existía contacto con cuidados sanitarios¹⁸⁴, considerándose, por tanto, SARM adquiridos en la comunidad (SARM-AC). Desde entonces, se han publicado numerosos casos de infecciones producidas por SARM-AC en diferentes grupos relativamente aislados de la sociedad, como nativos americanos, jugadores de fútbol, reclusos y militares, entre otros¹⁸⁵⁻¹⁹⁷. Además, esta definición fue extendida a otros grupos o individuos, que no estaban completamente aislados de la sociedad, sino que no presentaban factores de riesgo conocidos para SARM, como haber estado hospitalizados, haber sido sometidos a cirugía, diálisis o cateterismos, entre otros.

La lista de factores de riesgo, tanto para infección como para colonización por esta bacteria, ha ido en aumento. Actualmente existe, incluso, una lista de factores de riesgo que predisponen a colonización e infección por SARM-AC (Figura 2. 9). Uno de estos factores se encuentra en los neonatos, habiéndose detectado varios brotes de SARM-AC en ellos¹⁹⁸⁻²⁰⁰, asociados a la visita de los padres²⁰¹, mastitis de la madre²⁰²⁻²⁰³, leche materna²⁰⁴, infección de la madre en el momento del parto²⁰⁵ y al contacto con los trabajadores del hospital portadores o con infección por la bacteria⁹⁶⁻⁹⁹. Los niños en los primeros años de vida también pertenecen al grupo de riesgo de padecer una infección por un SARM-AC. Si bien, según David y Daum, parece que este riesgo es mayor en Estados Unidos¹¹⁹, donde, además, el caso de infecciones y colonizaciones por SARM-AC en niños va en aumento²¹⁰⁻²¹³. No obstante, esto puede ser debido a que en Estados Unidos se realiza un mayor número de controles de esta bacteria. Por otro lado, la frecuencia con la que han sido publicadas infecciones por SARM en diferentes tipos de deportistas y otras actividades relacionadas²¹⁴, ha hecho colocar a este colectivo dentro del grupo de riesgo para estas infecciones. El riesgo identificado dentro del grupo de los deportistas es compartir artículos de higiene personal, como toallas, jabón o ropa²¹⁵, sumado, en ocasiones, a pobres hábitos de higiene^{216,217}. La transmisión de cepas SARM entre miembros de una familia ya había sido documentada antes de la aparición de los SARM-AC, pero datos sobre la transmisión de cepas comunitarias en todo el mundo ha hecho que el contacto familiar sea introducido en el grupo de riesgo²¹⁸⁻²²⁸. La actividad sexual o simplemente el contacto piel con piel deben ser los responsables de esta transmisión en

familias²²⁹, aunque se necesita más información sobre el papel que juega el contacto en dicha transmisión. La relación entre las infecciones por SARM-AC con situaciones sociales desfavorecidas, se ha establecido únicamente en Estados Unidos, con la excepción de un estudio realizado en Alberta (Canadá), donde se asociaron con gente sin hogar²³⁰. También se ha demostrado que tener contacto con animales es un factor de riesgo para sufrir una infección por SARM-AC. Así por ejemplo, la cepa ST398 es la más comúnmente detectada en el ganado europeo, la cual, curiosamente, no puede ser identificada mediante electroforesis en campo pulsado o PFGE (del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) ya que presenta resistencia a la digestión por la enzima *SmaI*²³¹. Varios estudios han indicado una alta correlación entre la colonización asintomática de esta cepa en cerdos y sus criadores, sugiriendo que la transmisión entre ambos ocurre frecuentemente^{232,233}, uno de ellos ha sido publicado recientemente en Tenerife²³⁴. No obstante, la expansión secundaria entre humanos suele encontrarse en baja frecuencia²³⁵. Un caso de infección fue descrito en Italia, donde un granjero cuidador de cerdos desarrolló una piomiositis causada por una cepa SARM ST398²³⁶, y en España se ha publicado recientemente una SSTI causada por esta cepa también en un granjero^{232,233}. No obstante, los casos de infecciones por esta cepa son poco frecuentes.



Figura 2. 9. Esquema de grupos de riesgo detectados en la sociedad para padecer infección por SARM-AC.

Debido a la gran cantidad de publicaciones referentes a aislados SARM-AC, el Centro para la prevención y el control de enfermedades o CDC (del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*) estableció en 1999 lo que se deben considerar criterios fundamentales para distinguir un aislado comunitario de uno hospitalario²³⁷. Estos criterios exponen que un aislado SARM será un SARM-AC si:

1º) El aislado se obtiene a partir de un paciente externo al hospital, o en el caso de uno ingresado en él, si se obtiene en menos de 48 horas tras su ingreso.

2º) El paciente no tiene historia médica de infección ni colonización por SARM.

3º) El paciente no ha sido sometido en el último año a hospitalización, diálisis, cirugía.

4º) El paciente no dispone de cateterismo, ni ningún dispositivo médico invasivo, es decir, que vaya colocado a través de la barrera de la piel.

Además, el análisis de estas cepas mediante técnicas microbiológicas y moleculares ha mostrado que presentan diferencias con respecto a SARM-AH. Estas diferencias incluyen:

- 1) Portan el SCC*mec* tipo IV o V, que como hemos visto, son los casetes más pequeños y, presumiblemente, más móviles que los otros casetes más pesados²³⁸, aunque existen pocos datos que constaten esta movilidad¹³³. El paso de SARM a la comunidad ha sucedido probablemente por transferencia de cepas SARM de portadores a otros individuos y además por transferencia de estos casetes pequeños a SARM de SARM e incluso de otras especies de estafilococos coagulasa negativos²³⁹. Estas transferencias probablemente sucedan por la presencia de antibióticos²⁴⁰⁻²⁴².
- 2) Presencia de la leucocidina de *Panton-Valentine* o PVL (del inglés *Panton-Valentine Leukocidin*), que es muy raro encontrar en SARM-AH²³⁸. Se trata de una toxina con dos componentes (F y S), formadora de poros en la membrana de los leucocitos polimorfonucleares. Además, el PVL parece mostrar asociación con infecciones invasivas de piel, como furunculosis y absceso cutáneo²⁴². Si bien, actualmente existen controversias en cuanto a la acción de esta exoproteína y su función en la virulencia de las cepas que lo portan, lo que analizaremos más adelante.
- 3) Baja probabilidad de encontrar cepas multirresistentes en la comunidad²³⁸.

- 4) Pertener a los STs: ST1, ST8, ST30, ST80²⁴³, siendo la cepa USA300 (pertenece al ST8) la más prevalente en Estados Unidos²⁴⁴⁻²⁴⁸. La cepa ST1 porta el SCC*mecIV*, es normalmente susceptible a muchos de los antibióticos no β-lactámicos, y ha sido comúnmente asociada a infecciones de piel y tejidos blandos. Esta cepa carece de los genes *pvl*, y ha sido detectada fundamentalmente en la comunidad de Australia, donde ha sido designada WA-SARM-1²⁴⁹⁻²⁵¹, e Inglaterra^{252,253}. La cepa ST8 porta frecuentemente el PVL y el SCC*mecIV*, y como hemos visto, dentro de este ST se encuentra el USA300, clon predominante en la comunidad en Estados Unidos. La cepa ST80 porta frecuentemente el SCC*mecIV* y produce el PVL. Ha sido detectada frecuentemente causando infecciones de piel en la comunidad²⁵⁴ en países del oeste de Europa, como Austria²⁵⁵, Noruega²⁵⁶, Dinamarca^{257,258}, Suecia²⁵⁹, Inglaterra^{252,253}, Suiza²⁶⁰ y Grecia^{261,262}, por lo que se denomina coloquialmente el clon Europeo. No obstante, también ha sido detectado en otras partes del mundo, como Kuwait²⁶³, Tunisia²⁶⁴ y Egipto²⁶⁵. Las cepas ST30 portan el PVL y se cree que proceden de SARM en los que se ha insertado el SCC*mecIV*¹⁵⁷. La cepa ST30 ha sido detectada en aislados con diversas características fenotípicas, procedentes de numerosos países^{138,254,263,265-271}.

Además de estas características genotípicas, se ha observado que los aislados comunitarios afectan a una población diferente a la que afectan los hospitalarios, y causan síndromes clínicos distintos. De ese modo, las infecciones por SARM-AC afectan a los pacientes más jóvenes, y causan de manera predominante infecciones de piel y tejidos blandos o SSTIs^{191,250,272}. No obstante, aunque menos frecuentemente, las cepas comunitarias también han sido asociadas a infecciones más graves como la neumonía necrotizante o sepsis²⁷³⁻²⁷⁶.

Se han realizado estudios en poblaciones de personas que han padecido infecciones por ambos grupos de SARM, encontrando que en las poblaciones afectadas por infecciones con SARM-AC, el ratio de portadores nasales era mayor, en un rango del 4 al 6%, que en el caso de aquellas con infecciones por SARM-AH²⁴⁴. Existen varias hipótesis que intentan explicar la aparición de SARM en la comunidad, aunque ninguna de ellas está demostrada, y ninguna puede explicar los datos epidemiológicos observados. Así por ejemplo, debido a que los SARM-AC fueron detectados por primera vez a finales de la década de los 90, años en los que se produjo un incremento en el uso de las fluoroquinolonas, se ha sugerido que ambos eventos podrían tener relación^{119,277,278}. Sin embargo, aún no se ha dilucidado el mecanismo

que los uniría, además de que esto no explicaría, por ejemplo, la detección de cepas SARM-AC susceptibles a las fluoroquinolonas. Sin embargo, en un estudio realizado en Reino Unido, entre los años 2000 y 2004, se ha observado una relación directa entre el riesgo de sufrir una infección por SARM-AC y la prescripción de antibióticos, especialmente de las fluoroquinolonas²⁷⁹. Otros autores han observado que el incremento en el ratio de SARM-AC en el año 2000 fue simultáneo a la introducción de una vacuna neumococal conjugada en niños (Pevnar) en Estados Unidos, sugiriendo que existía relación entre ambos sucesos. La recomendación de esta vacuna se realizó únicamente en Estados Unidos, y en el año 2002 se extendió a Canadá, año en el que se produjo aquí un incremento en el ratio de SARM-AC. Sin embargo, en Japón y Australia los SARM-AC eran ya frecuentemente aislados cuando se introdujo esta vacuna en el año 2005, y continúan siendo poco frecuentes en Reino Unido, donde se comenzó a aplicar la vacuna en el año 2006. Actualmente el uso de la vacuna Pevnar se extiende a múltiples países²⁸⁰, mientras que no en todos se detectan frecuentemente infecciones por SARM-AC. Una explicación biológica para la relación entre SARM-AC y el Pevnar podría ser que la vacuna disminuye los portadores asintomáticos de *Streptococcus pneumoniae*, dejando un nicho libre que pasaría a ocupar SARM. Esta hipótesis queda apoyada por un estudio realizado en Israel en 790 niños sanos donde se observó que la co-colonización de *S. pneumoniae* y *S. aureus* era muy poco frecuente²⁸¹. De hecho, en un estudio en los Países Bajos se observó una frecuencia de *S. aureus* mayor causando otitis media en niños después de ser vacunados con Pevnar, aunque no encontraron pruebas que demuestren que la co-colonización de estas dos especies sea poco común²⁸².

Los distintos estudios que existen en la literatura sobre SARM-AC han elegido, para catalogar dichos aislados comunitarios, algunas de las características descritas previamente. Debido a que cada grupo de investigación aplica criterios distintos, resulta muy difícil comparar estudios y calcular el ratio total de colonización e infección producido por ellos²⁸³. Sin embargo, en general, se ha visto que el número de infecciones producidas por SARM-AC es cada vez mayor²⁸³⁻²⁸⁵. Por ejemplo, en Los Ángeles, se observó un incremento de las SSTIs adquiridas en la comunidad causadas por SARM de un 29% en los años 2001-2002 a un 64% en 2003-2004²⁸⁵. Lo mismo ocurrió en Australia, donde el porcentaje de aislados SARM-AC aumentó de un 4.7% en el año 2000 a un 7.3% en el 2004²⁸⁴.

Además de que el número de infecciones por SARM-AC parece estar incrementando, estas cepas parecen estar introduciéndose en ambientes hospitalarios, así

como los clones nosocomiales saliendo a la comunidad, borrando de ese modo la “línea” entre la comunidad y el hospital^{286,287}. Debido a este paso de cepas hospitalarias a la comunidad, se ha propuesto el término, SARM-CO, que procede del inglés *Community Onset*²⁸³ o posteriormente SARM-HACO, del inglés *Health care-Associated, Community-Onset*²⁸⁸. Con el primero nos referimos a cepas que se encuentran circulando en la comunidad, sin tener en cuenta si su origen ha sido comunitario u hospitalario, mientras que con el segundo término nos referimos a cepas que se encuentran relacionadas con el ambiente hospitalario, pero que actualmente se encuentran en la comunidad. Toda esta terminología procede de la primera creencia de que SARM se encontraba exclusivamente circulando en ambientes hospitalarios, por lo que algunos autores creen en la necesidad de una nueva nomenclatura que refleje mejor la epidemiología actual de SARM¹¹⁹.

La base del incremento de la virulencia de cepas SARM-AC es completamente desconocida. Muchos factores han sido propuestos, tales como el aumento del *fitness*, mejor evasión del sistema inmune del hospedador y producción de toxinas concretas²⁸⁹. Uno de estos factores diferenciadores parece ser el elemento móvil catabólico de la arginina o ACME (del inglés *arginine catabolic mobile element*). Se trata de un elemento de ADN de 3.9 kb, que codifica una arginina deiminasa que convierte la L-arginina en dióxido de carbono, ATP y NH₄. Su secuencia contiene con 33 pautas de lecturas abiertas (*orfs*), y se ha detectado frecuentemente en cepas de estafilococos coagulasa negativos. En las cepas en las que aparece se encuentra integrado en la *orfX*⁶, el mismo sitio de inserción del *SCCmec*, por lo que se cree que las recombinasas que median la escisión del *SCCmec*, movilizan también este elemento^{6,290}. Se ha postulado que su rol en la patogénesis de cepas SARM-AC podría ser aumentar su habilidad para colonizar la piel de gente sana, y por lo tanto, facilitaría su dispersión en la comunidad, si bien no existen datos experimentales que apoyen dicha hipótesis⁶. En un ensayo de *fitness* competitivo en un modelo de conejo, la cepa USA300 salvaje (ACME⁺) presentó un *fitness* superior, medido por la carga diferencial de bacterias en tejidos en autopsias, comparado con un mutante isogénico PVL⁻ *SCCmec*⁻. Los autores concluyeron que la ausencia del ACME disminuye significativamente el *fitness* de la cepa USA300 *in vivo*, por lo que este elemento podría presentar un papel central en la patogénesis de las infecciones por esta bacteria²⁹⁰. Sin embargo, Montgomery *et al.* no encontraron diferencias entre la virulencia de las cepas USA300 y las isogénicas ACME⁻ en un modelo de

rata de neumonía necrotizante y de infección de piel²⁹¹. Por lo tanto, se necesitan más estudios para poder elucidar la función de este elemento en *S. aureus*.

Sin embargo, sin duda, la principal toxina relacionada con las cepas SARM-AC es el PVL, que, incluso ha sido considerada por algunos autores como un marcador de SARM-AC²³⁸. Se trata de una proteína formadora de poros, constituida por dos componentes codificados por los genes *lukF-PV*, de 34 kDa, y *lukS-PV*, de 32 kDa²⁹². Fue descrita por primera vez en 1894 por Van de Velde²⁹³, pero se distinguió completamente de las hemolisinas por su leucotoxicidad, a la vez que se asoció con SSTIs en 1932 por Panton *et al.*²⁹⁴. Se ha visto que es estructuralmente similar a la Hemolisina- γ (Hlg- γ). Ambas constan de una subunidad S (de elusión lenta), LukS-PV en el PVL, y HlgA y HlgB en la Hlg- γ ; y una subunidad F (de elusión rápida), LukF-PV y HlgB, respectivamente. Estas subunidades pueden intercambiarse, existiendo siempre una subunidad S y una F, por lo que una bacteria que posea todos los genes podría producir hasta 6 toxinas diferentes²⁴².

Los genes *lukF-PV* y *lukS-PV* residen en varios fagos temperados con forma icosaédrica o de cabeza elongada²⁹⁵, como por ejemplo los fagos ϕ Sa2958, ϕ Sa2MW, ϕ PVL, ϕ 108PVL, ϕ SLT, ϕ Sa2USA^{6,296}. La transmisión de los distintos fagos en los diferentes linajes de SARM debe estar limitada por factores dependientes, tanto del fago como de la bacteria. Después de la infección, estos fagos se lisogenizan en el genoma bacteriano por vía integrativa²⁹⁷, pero el *locus* cromosómico en el que este proceso tiene lugar no ha sido aún identificado, así como continúa siendo desconocida la región específica de acoplamiento en los distintos fagos.

Se ha observado que las cepas productoras de PVL dejan secuelas clínicas más severas que las no productoras de esta toxina. Por ejemplo, la neumonía asociada con *S. aureus* PVL⁺ se asocia frecuentemente con sepsis, fiebre alta, leucopenia, hemoptisis, efusión pleural, y muerte²⁹⁸. Esto fue demostrado en modelo de conejo, en el cual, si la carga bacteriana es elevada, la concentración de PVL alcanza la concentración suficiente para activar los polimorfonucleares (PMNs) y macrófagos, que liberan mediadores proinflamatorios, por lo que promueve el reclutamiento de PMNs dentro del pulmón inflamado. Entonces, el PVL lisa los PMNs, produciendo la liberación del contenido de los gránulos, como proteasas o compuestos reactivos del oxígeno. Estos productos dañan el epitelio pulmonar y las barreras endoteliales, llevando a un escape de fluido y proteínas desde

el espacio vascular al espacio alveolar (Figura 2. 10). A continuación, se produce edema pulmonar, daño del tejido y necrosis pulmonar hemorrágica, que conducen a la muerte del animal²⁹⁹.

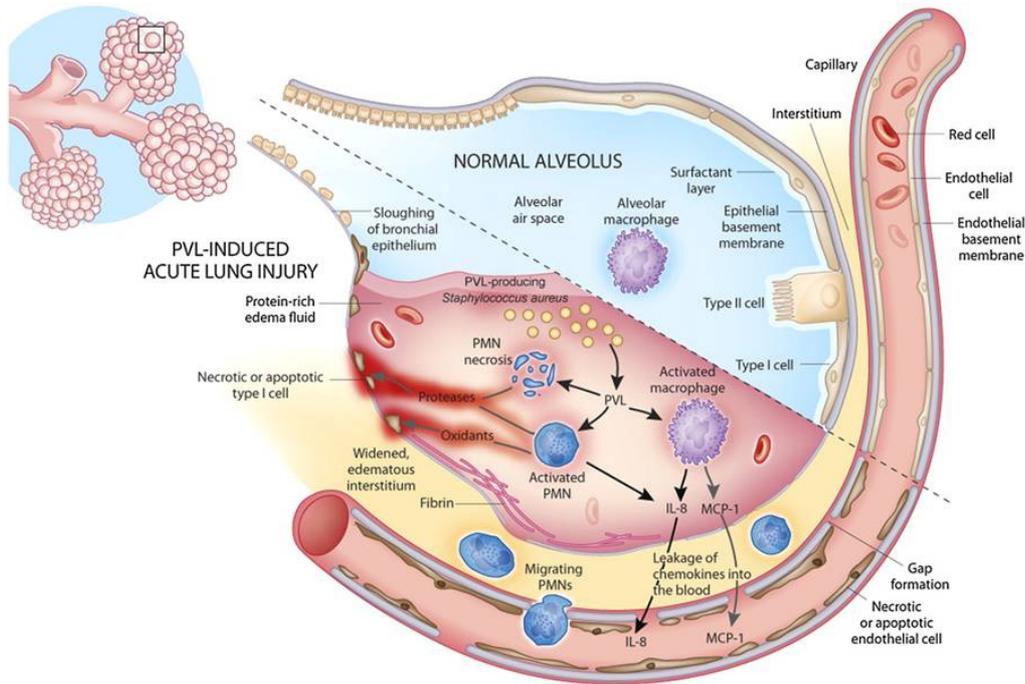


Figura 2. 10. Mecanismo de inflamación y daño del pulmón inducidos por el PVL en el alveolo, propuesto por Diep *et al.*²⁹⁹, comparado con un alveolo normal. En su ilustración, indica con flechas negras los sucesos que observaron en su estudio, mientras que las flechas grises señalan los eventos que postulan.

En modelos animales se ha observado que el PVL es dermonecrótico lo que quizás explique la relación de las cepas portadoras del PVL con SSTIs^{300,301}. El LukS-PV se une a un receptor no identificado de la membrana de los PMNs, donde dimeriza con el LukF-PV, para posteriormente unirse alternativamente LukS-PV y LukF-PV, hasta formar un heptámero. Cuando el primer LukS-PV se une, una proteína kinasa lo fosforila, produciendo la apertura de canales de Ca^{2+} del PMN³⁰². Por lo que se debe producir un aumento en la producción de interleucinas y mediadores inflamatorios, a través de un mecanismo de transducción de señal. Además, se ha observado que el efecto del PVL depende de la concentración en la que éste se encuentre, pudiendo causar lisis o apoptosis de los PMNs (Figura 2.11)³⁰³, produciéndose este último caso, probablemente, a través de un mecanismo de apertura de poros en la membrana

de la mitocondria, mediante la activación de las caspasas 9 y 3³⁰⁴. En humanos las lesiones de cepas SARM productoras de PVL en SSTIs, se parecen, frecuentemente, a mordeduras de arañas^{305,306}, pero se debe tener en cuenta que las arañas habituales de las casas no son portadoras de SARM³⁰⁷, y no existe correlación entre la distribución de las arañas ermitañas y las infecciones por SARM-AC¹¹⁹.

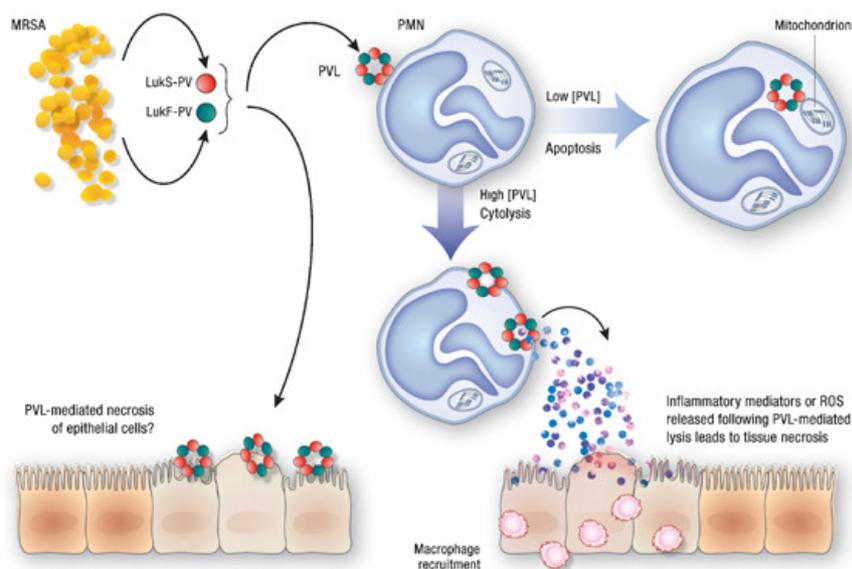


Figura 2. 11. Representación del modelo propuesto por Boyle-Vavra y Daum³⁰³, sobre cómo causa el PVL necrosis del tejido. En esta propuesta, la alta concentración del PVL produce lisis de los PMNs, mientras que concentraciones bajas de la toxina median una vía de apoptosis de los PMNs, actuando directamente en la membrana mitocondrial³²⁰.

No obstante, la importancia del PVL en SSTIs y neumonías necrotizantes es muy discutida. En un estudio realizado en 2006, se observó que la presencia o ausencia de los genes *pvl* en cepas SARM no afectaba a la virulencia de estas cepas en modelos de ratón en estudios de sepsis y SSTIs, y que su presencia no influía negativamente en la supervivencia de los neutrófilos en ensayos *in vitro*³⁰⁸. Por otro lado, Wardenburg *et al.* encontraron que la presencia o ausencia del PVL no afectaba al ratio de mortalidad en un modelo de neumonía de ratón; además de que la ausencia de los genes *pvl* en mutantes delecionados para esos genes no alteraba la citotoxicidad de las cepas empleadas en un estudio *in vitro* en células del epitelio alveolar humano³⁰⁹. Los mismos autores, además, en un estudio realizado posteriormente, no encontraron diferencias en la neumonía y en absceso de piel en modelos de

ratón después de la inoculación con la cepa del estudio, denominada USA300, portadora del PVL y su isogénica sin los genes que codifican para tal toxina³¹⁰. De forma contraria a estos resultados, Labandeira-Rey *et al.* demostraron que la proteína PVL purificada causa neumonía necrotizante en modelos de ratón³¹¹. También Diep *et al.* observaron que al inocular por vía intravenosa una mezcla 1:1 de la cepa USA300 PVL⁺ y su isogénica PVL⁻ tras 48 horas, la cepa PVL⁺ estaba presente en mayor densidad en los riñones homogeneizados de los conejos sacrificados, sugiriendo que el PVL puede aportar un beneficio mayor en la supervivencia de las cepas SARM en este modelo²⁹⁰. Tseng *et al.* observaron, en un modelo de miositis en ratones jóvenes, que el PVL fue responsable del incremento en el daño del tejido muscular, pero no en ejemplares viejos, empleando un aislado SARM PVL⁺ obtenido a partir de un paciente con neumonía necrotizante y su isogénico PVL⁻. Estos autores postularon que en los ratones más jóvenes se produciría una mayor respuesta de los neutrófilos frente al PVL, conduciendo a daño más severo en el músculo³¹². Hongo *et al.*, en su modelo de ratón BALB/c, observaron que el PVL no producía la lisis de los neutrófilos, pero que la actividad lítica contra los neutrófilos humanos de sobrenadantes de las cepas USA300 y USA400, ambas PVL⁺, fue eliminada en la presencia de anticuerpos monoclonales anti-PVL³¹³. Con toda esta controversia, Löffler *et al.* analizaron la actividad del PVL en diferentes modelos animales, observando que éste no producía la lisis de los neutrófilos de monos ni ratones, pero sí lo hacía en neutrófilos de conejos y humanos³¹⁴. Estos resultados explicarían las diferencias obtenidas en los estudios anteriormente mencionados, apoyando la importancia del PVL en las infecciones por SARM-AC en humanos, mientras que demuestran que los modelos de ratón no son adecuados para estudios con el PVL.

El conflicto existente sobre el rol del PVL en la patogénesis de las infecciones por SARM-AC también puede estar relacionado con la cantidad de PVL producido por cada cepa de forma particular. Lo que queda apoyado por los resultados de Varshney *et al.*, que demostraron que la producción de PVL varió considerablemente entre cepas SARM y SASM de una amplia colección. Cuando emplearon las cepas con la mayor producción en un modelo de infección dérmica en ratones, las lesiones en la piel fueron mayores, y mayor aún la carga bacteriana en las lesiones transcurridos 7 días³¹⁵. Además de esto, las diferencias encontradas entre los distintos estudios también podrían estar relacionadas con la variación genética detectada en los genes *pvl*. En una colección internacional de aislados de *S. aureus* se han descrito dos variantes, denominadas R y H, que difieren en un único aminoácido. La variante

R fue detectada exclusivamente en las cepas denominadas USA300 y USA400 de Estados Unidos, mientras que la variante H, fue más común en cepas SASM en todo el mundo³¹⁶. En otro estudio realizado con una colección distinta de *S. aureus*, la variante R fue encontrada nuevamente en las cepas USA300 y USA400 y también en un aislado clínico perteneciente al CC93 de Australia, mientras que la variante H esta presente en SASM y en SARM-AC de todo el mundo, salvo Estados Unidos³¹⁷. Por lo tanto, es posible que estos polimorfismos influyan en la función del PVL, lo que podría llegar a explicar los resultados contradictorios obtenidos en los estudios de virulencia con modelos animales. Aunque, la importancia de estos polimorfismos es una cuestión que requiere futuras investigaciones³¹⁸.

Los genes que codifican el PVL se transmiten entre cepas *S. aureus* por bacteriófagos y se creían que se encontraban en menos de un 5% de los aislados de *S. aureus*^{242,294}, antes de la llegada de las cepas SARM-AC. Después de esto, en Estados Unidos, las cepas portadoras de los genes del PVL han sido asociadas en numerosas ocasiones con dichas cepas comunitarias. Aproximadamente del 60%-100% de las cepas SARM-AC mostraron la presencia de esta toxina. Por ejemplo, en el año 2002 en un estudio realizado en Minnesota se observó que el 77% de los aislados SARM-AC (según la definición del CDC) producían el PVL, mientras que solo un 4% de los aislados SARM-AH lo hacían²⁷². Lo mismo se observó en un estudio de 812 militares en Texas en 2003, donde el 66% de las 45 cepas SARM que se encontraban colonizando las fosas nasales de éstos, o causándoles infección, eran PVL⁺¹⁹³. En Europa el número de infecciones producidas por cepas SARM-AC PVL⁺ es menor que las detectadas en Estados Unidos. Así por ejemplo, en un trabajo realizado en Irlanda de 1999-2005, solo un 22.2% de los aislados SARM-AC (según la definición del CDC) fueron PVL⁺²⁶⁸. No obstante, esto puede ser debido a que quizá en Estados Unidos se siguen controles más exhaustivos de estas cepas.

El motivo de esta fuerte asociación del PVL con las cepas comunitarias se desconoce, y no existe con otra toxina^{67,273,319}. Podría contribuir en su *fitness* y/o virulencia o podría simplemente ser un marcador de otros determinantes de *fitness* y/o virulencia. Hasta el momento, las cepas PVL⁺ descritas presentan también el SCC*mec* tipo IV, V o V_T en genotipos variados en muchas regiones geográficas^{140,320}. Esto hace pensar que existe alguna relación entre ambos elementos, aunque el sitio de inserción de los genes *pvl* carece de unión genética conocida con el sitio de inserción del SCC*mec*.

2.1.5. Prevención de infecciones por SARM-AC

Las medidas de control de las infecciones en los hospitales y demás centros sanitarios recaen en el trabajo conjunto del gobierno y los profesionales de la salud³²¹⁻³²³. Las guías que se siguen en los hospitales para prevenir las infecciones son sensibles frente a la resistencia de SARM a muchos desinfectantes³²⁴, sin embargo, la mayoría fallan al no incluir acciones específicas, como la identificación activa de los portadores de SARM mediante seguimiento de las poblaciones consideradas de alto riesgo, el aislamiento de individuos colonizados, la descolonización de estos individuos y la desinfección medioambiental empleando medios químicos o luz³²⁵.

En el caso de las infecciones producidas por SARM-AC, este control resulta más complicado aún, debido, entre otros factores, a los fómites. Éstos son objetos o sustancias inanimadas que transportan agentes infecciosos, participando, por tanto, en su transmisión de un individuo a otro. Aislados SARM han sido recuperados de fregaderos, encimeras, grifos, esponjas, platos de comida de las mascotas, bandejas de las tronas de los niños, y otras superficies de las casas³²⁶. La importancia de la contaminación de estos fómites es tal, que en un estudio realizado a Alemania de 1995 a 2001 observaron que la descolonización de los trabajadores de salud tuvo éxito únicamente cuando se desinfectaron concienzudamente estas superficies en sus casas³²⁷.

El gluconato de clorhexidina es un antiséptico de la piel empleado en los ambientes hospitalarios desde los años 50. Este compuesto es bactericida para muchos patógenos, incluido SARM^{328,329}. Se emplea comúnmente en duchas previas a intervenciones quirúrgicas. Estas duchas, junto con la revisión de la colonización nasal de todos los pacientes de nuevo ingreso, el aislamiento de dichos pacientes colonizados y la aplicación en rotación de tres pomadas nasales descolonizadoras, resultaron exitosas en la reducción de las infecciones por SARM en una Unidad de Cuidados Intensivos en Inglaterra, aunque el efecto independiente del gluconato de clorhexidina en este caso, se desconoce³³⁰. En la comunidad no ha sido estudiado rigurosamente, aunque sí que se recomienda en los protocolos de descolonización de pacientes con infecciones por SARM recurrentes. No obstante, en un estudio de

descolonización mediante limpieza de piel con gluconato de clorhexidina en una cohorte de soldados, no supuso una reducción en la incidencia de SSTIs producidas en estos³³¹.

La mupirocina ha sido empleada como agente descolonizador, tanto dentro, como fuera del ambiente hospitalario, pero algunos datos cuestionan su eficacia^{166,332}. Una revisión de 4 ensayos controlados mostró una disminución significativa en los ratios de infecciones post-quirúrgicas entre los pacientes colonizados por *S. aureus* que fueron tratados previamente con mupirocina, comparado con el grupo placebo y el no tratado³³³. Sin embargo, en una revisión realizada previamente no se encontraron evidencias que apoyen esta práctica generalizada de terapia antimicrobiana de uso tópico o sistémico para descolonizar a portadores de SARM, nasales o de otra parte del cuerpo³³⁴. En la comunidad se han realizado pocos estudios sobre esta terapia descolonizadora. Uno de ellos fue realizado entre 3447 soldados de la Armada de Texas, y se observó que, a pesar de que la mupirocina fue efectiva en la descolonización de SARM, frente al grupo que fue tratado con placebo, el ratio de incidencia de las infecciones de piel por SARM fue similar en los dos grupos³³⁵. En otro estudio, se observó que la mupirocina fracasó, incluso, en la descolonización de portadores de SARM³³⁶, por lo que no existen evidencias de que éste, ni otro agente antimicrobiano intranasal, debiera ser empleado en la descolonización en ambientes comunitarios.

Debido al fracaso, cada vez mayor, de los antibióticos frente a *S. aureus*, desde hace años ha venido ensayándose en animales el empleo de estrategias inmunoterapéuticas para la prevención de infecciones por SARM. Varios estudios han dirigido vacunas frente a toxinas producidas por esta bacteria^{337,338,339}. Fundamentalmente se ha descrito efecto protector de estas vacunas en ratones, conejos y monos, al ser dirigidas a las enterotoxinas estafilococales A^{340,341}, B³⁴²⁻³⁴⁴ y TSST-1^{343,345}, las cuales son superantígenos bacterianos que desempeñan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la infección³⁴⁶. Las vacunas más modernas, basadas en partes de la bacteria, como proteínas purificadas, presentan el inconveniente de producir, frecuentemente, una fuerte respuesta inmune. El reto más importante en este tipo de estrategia, es la elección del adyuvante adecuado, que estimule la respuesta inmune específica del antígeno, disminuyendo los efectos adversos. Recientemente, se ha propuesto el ácido lipoteicoico tipo 1, como diana efectiva para vacunas, no solo frente a infecciones por *S. aureus*, sino que frente a múltiples patógenos Gram positivos, en modelos de ratón y conejo³⁴⁷. No obstante, en ningún caso se ha procedido a su aplicación en humanos debido a la complejidad de la bacteria. Nuevos datos apuntan a las células T-helper 17 y la

interleucina 17, liberada por ellos, como dianas que podrían hacer pausable el desarrollo de una vacuna efectiva frente a *S. aureus*³⁴⁸. Sin embargo, este tipo de prevención, si bien parece prometedora para el futuro, no se encuentra disponible actualmente, por lo que se deben emplear herramientas factibles en este momento, lo más útiles posibles.

Sin duda, la mejor prevención de infecciones por SARM comienza con buenos hábitos de higiene, tanto personal, como del ambiente que nos rodea. En los casos concretos en los que se deba proceder a descolonización debería determinarse previamente el tipo de SARM a eliminar, y sobre todo su perfil de resistencia antimicrobiana. Además, tal y como se ha explicado en el capítulo 1, estudios epidemiológicos en cada población, tanto de infecciones como de colonizaciones, podrían agilizar la toma de decisiones al establecer la profilaxis, ayudando a controlar la expansión de esta bacteria.

2.2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este segundo capítulo han sido:

1. Detectar a nivel molecular en cada uno de los aislados SARM, recuperados de pacientes comunitarios, determinados genes de resistencia y virulencia de interés; principalmente los genes de resistencia *mecA* e *ileS2* que codifican para la resistencia a meticilina y a altas concentraciones de mupirocina, respectivamente, y los genes que codifican para la leucocidina de *Panton-Valentine* y la Hemolisina- γ .
2. Confirmar en aquellos aislados SARM que presenten resistencia a altos niveles de mupirocina la localización plasmídica del gen *ileS2*, responsable de dicha resistencia.
3. Caracterizar mediante experimentos de PCR en tiempo real los niveles de expresión del gen *ileS2* en los aislados SARM portadores de dicho gen, y estudiar su posible relación con el fenotipo de resistencia a altas concentraciones de mupirocina mostrado por cada aislado.
4. Identificar genóticamente los distintos clones de SARM que se encuentran circulando en nuestra comunidad.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Aislados clínicos, pacientes y período de estudio

En este estudio se incluyeron aislados SARM recibidos por el Servicio de Microbiología del HUNSC durante el periodo de julio de 2004 a mayo de 2007, un total de 34 meses. Dentro de esos aislados se realizó una selección de aquellos que, aplicando las directrices marcadas por el CDC¹⁸⁶, encajaban con el perfil de SARM-AC. Según el CDC una infección es causada por un SARM-AC si:

1. Éste fue aislado de un paciente externo al hospital o de uno interno en él si fue obtenido dentro de las primeras 48 horas tras su ingreso. En nuestro caso, los aislados fueron obtenidos de los Centros de Salud del Puerto de la Cruz, Tacoronte, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Candelaria, Güimar, Granadilla de Abona y Arona, y de las consultas externas del HUNSC, incluyendo el Servicio de Urgencias (Figura 2. 12).
2. El paciente no tiene historia clínica de infección ni colonización por un SARM.
3. El paciente no ha sido sometido en el último año a hospitalización, cirugía, diálisis, ni haber vivido en una residencia de ancianos.
4. El paciente no tiene catéter subcutáneo, permanente ni dispositivos médicos invasivos.

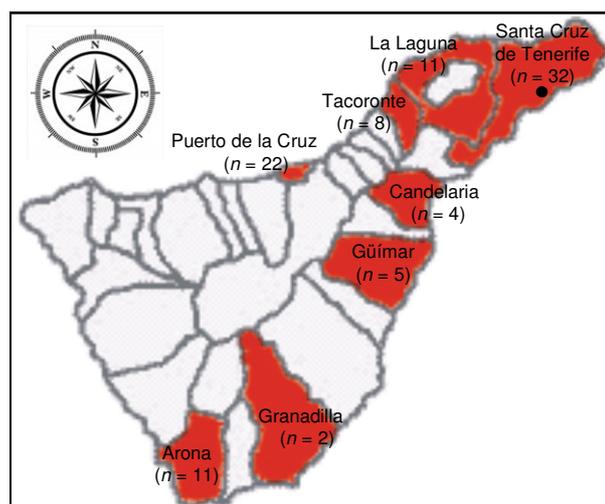


Figura 2. 12. Esquema de la isla de Tenerife. En rojo se encuentran señalados los municipios de donde procedieron las muestras incluídas en este estudio, indicando el número (n) de aislados SARM recuperado en cada uno de ellos. El punto negro indica el lugar donde se halla ubicado el HUNSC.

Tras este proceso de selección, 100 aislados SARM fueron considerados SARM-AC y, por lo tanto, fueron incluidos en este estudio.

Además, de los aislados del estudio, se incluyeron dos cepas de *S. aureus* de colección para utilizarlas como referencia en algunos análisis moleculares. Las cepas incluidas fueron la de la Colección Americana de Cultivos Tipo o ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*) 25923 y la cepa de la Colección Nacional de Cultivos Tipo de Reino Unido o NCTC (del inglés *National Collection of Type Cultures*) 8325, cuyas características de interés en este trabajo se encuentran recogidas en la siguiente tabla (Tabla 2. 1).

Tabla 2. 1 Microorganismos tipos usados como control y/o marcador en los estudios posteriores.

Microorganismo	Genotipo relevante	Procedencia
ATCC 25923	Resistencia a mupirocina. Producción de la toxina <i>Panton-Valentine Leukocidin</i> .	ATCC. Estados Unidos.
NCTC 8325	Fragmentos de macrorrestricción por <i>SmaI</i> de tamaño conocido.	NCTC. Reino Unido.

Los siguientes datos clínicos y epidemiológicos fueron registrados para cada infección producida por un SARM-AC: sexo y edad del paciente, fecha de aislamiento, tipo

de muestra, municipio de origen, historia clínica previa e historia de infección o colonización por SARM.

2.3.2 Identificación fenotípica

La identificación morfológica y bioquímica fue llevada a cabo por el Servicio de Microbiología del HUNSC, y realizada según los criterios estándar y mediante sistemas automatizados. Estas pruebas incluyen la tinción de Gram, la determinación de la morfología de la colonia, el crecimiento en el medio agar sal manitol, la aglutinación en portaobjetos con el test StaphySlide[®] (bioMérieux, Francia), y los tests de la catalasa, coagulasa y DNasa.

2.3.3 Pruebas de sensibilidad antibiótica

Las pruebas de sensibilidad antibiótica fueron realizadas para todos los aislados *S. aureus* con el sistema Vitek 2 (Tarjeta AST-P559) (bioMérieux, Francia). Este sistema permite determinar para cada antibiótico la categoría de resistencia que presenta un aislado: susceptible [S], intermedia [I], o resistente [R], así como las CMIs, de acuerdo a los criterios para la interpretación de cada antibiótico publicados por el CLSI (del inglés *Clinical and Laboratory Standard Institute*)³⁴⁹. Todos los aislados fueron testados empleando un panel de 10 antibióticos: penicilina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina (metecilina), ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, mupirocina, teicoplanina y vancomicina. La diferencia en la sensibilidad frente a al menos uno de los diez antimicrobianos se consideró suficiente para marcar un antibiotipo diferente, representándose cada perfil con un número romano. La cepa *S. aureus* ATCC 25923 (Tabla 2. 1) fue incluida como control de calidad en las pruebas de sensibilidad antibiótica.

La confirmación de la resistencia a metecilina se realizó mediante una prueba estándar de difusión en discos con 30 µg de cefoxitina^{350,351}, colocando dicho disco en placas de Agar Mueller-Hinton (BioMérieux, Francia), incubadas 24 horas a 30° C según las instrucciones del CLSI. La inhibición del crecimiento fue interpretada según las directrices del CLSI. La

resistencia intermedia (diámetro alrededor del disco de 11 a 12 mm) fue confirmada con la CMI determinada con tiras E-test de oxacilina (AB Biodisk, Suecia).

También se analizó la sensibilidad a mupirocina mediante métodos previamente descritos^{352,353}. Se empleó el medio Agar Mueller-Hinton (BioMérieux, Francia), aplicando el método de Kirby-Bauer y usando discos de difusión (Becton Dickinson, Irlanda) de 5 µg y de 200 µg. El disco de 5 µg se utiliza para la determinación de resistencia frente a bajos niveles de mupirocina, existiendo sensibilidad a mupirocina cuando el halo es ≤ 14 mm. Y, aunque el CLSI no ha definido puntos de corte para interpretar la sensibilidad a la mupirocina, en su último documento publicado en 2011, establece las técnicas para la detección de cepas con resistencia a este compuesto. Para ello, recomiendan el uso del disco de 200 µg, que se empleó en este estudio, considerando sensible cualquier aislado que presentó cualquier halo de inhibición. El EUCAST (del inglés *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) plantea el uso del disco de 200 µg y los puntos de corte ≥ 30 mm (S) y ≤ 18 mm (R), pero exclusivamente para cepas implicadas en procesos de colonización nasal que requieran descolonización. En los casos en los que los aislados resultaron resistentes se comprobó la presencia de resistencia a altos niveles de mupirocina mediante tiras E-tests (AB Biodisks[®], Suecia), pudiendo calcular el valor exacto de la CMI en un rango de 0.064-1024 µg/ml, aplicando las normas del fabricante.

Todos los aislados clínicos, una vez caracterizados fenotípicamente, fueron congelados a -80° C en una mezcla del medio de cultivo BHI (del inglés *Brain Heart Infusion*) líquido y glicerol al 30% en tubos microbank[®] (pro-lab diagnostics, Canadá), permaneciendo de este modo puros y disponibles para posteriores análisis moleculares.

2.3.4 Identificación molecular de los SARM

Cada aislado fue recuperado a partir de los criotubos microbank[®] (pro-lab diagnostics, Canadá), congelados a -80° C, mediante siembra por agotamiento en placa con BHIA (del inglés *Brain Heart Infusion Agar*) para obtener colonias aisladas. Una colonia de cada aislado fue resuspendida en 50 µl de agua estéril y de dicha suspensión celular, 1 µl fue empleado como molde para la realización de una PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) triple. Dicha PCR amplifica simultáneamente los genes *femB* (marcador específico

de *S. aureus*), *mecA* (gen que amplifica en el caso de que exista resistencia a meticilina) e *ileS2* (gen que codifica resistencia a altas concentraciones de mupirocina), produciendo bandas de 651, 456 y 310 pb respectivamente³⁵⁴. Los cebadores empleados se encuentran recogidos en la Tabla 2. 8 del Anexo 2. 8. 2. La mezcla de PCR consistió en tampón de reacción al 1 X, dNTPs al 0.2 mM, MgCl₂ 3 mM, 1.5 µM de los cebadores *femB1*, *femB2* y 0.4 µM de *ileS2F*, *ileS2R*, *mecA1* y *mecA2*, y 1.25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido). El programa en el cual se llevaron a cabo las reacciones de amplificación se representa en la Figura 2. 13.

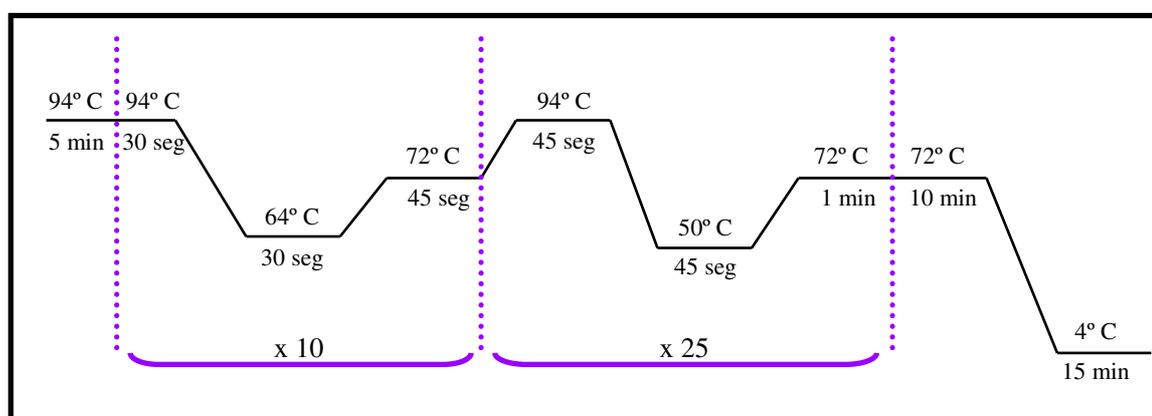


Figura 2. 13. Esquema del programa de la PCR triple empleada para la amplificación de los genes *femB*, *ileS2* y *mecA*³⁵⁴.

Tras la reacción de amplificación, fueron separados 5 µl de cada producto de PCR y mezclados con tampón de carga (0,15% de azul de bromofenol, 0,15% de xileno cianol, 30 de glicerol), de forma que éste quede a una concentración final de 1 X. La mezcla fue cargada en un gel de agarosa al 1% en TAE 1 X (preparado a partir de una solución de 1 litro de TAE 50 X: 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 37.2 g de EDTAo ácido etilendiaminotetraacético), realizando una electroforesis horizontal. Se utilizó el marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics, Suiza) para determinar el tamaño de los productos de amplificación mediante PCR. Los geles se visualizaron y se fotografiaron bajo luz ultravioleta, tras su tinción con bromuro de etidio, empleando el sistema GelDoc 2000 (Bio-Rad, Estados Unidos).

2.3.5 Detección de los genes codificantes de las toxinas PVL y Hlg- γ mediante PCR

Debido a la homología existente entre la secuencia de los genes que codifican para el PVL y aquellos que codifican para la Hlg- γ , para la detección de ambas toxinas se diseñaron cebadores que hibridaran en regiones únicas de ambas secuencias (Tabla 2. 9, Anexo 2. 8. 2.). Ambas PCR se realizaron con las mismas concentraciones de reactivos: tampón de reacción 1 X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 2 mM, cada uno de los cebadores PVLb-F y PVLb-R o 0,4 μ M de hlg1 y hlg2, y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido). Los programas de amplificación para los genes que codifican para el *pvl* y para la Hlg- γ se representan en las Figura 2. 14 y Figura 2. 15.

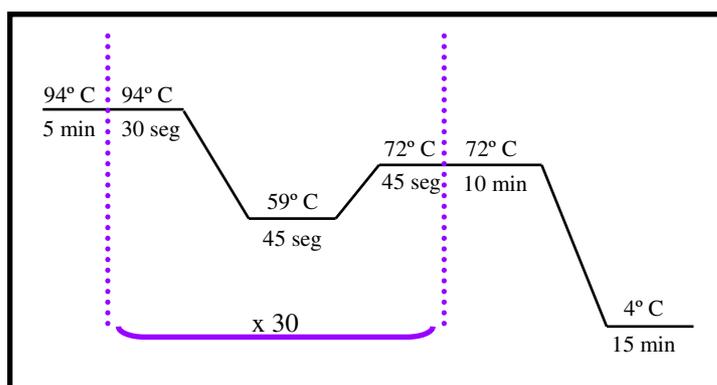


Figura 2. 14. Esquema del programa de la PCR empleado para la amplificación de los genes que codifican para la toxina PVL.

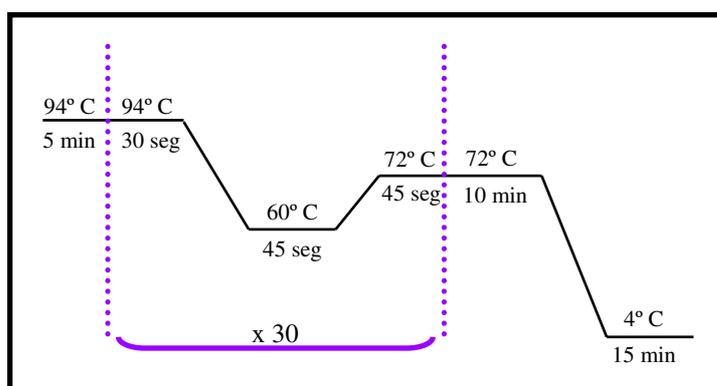


Figura 2. 15. Esquema del programa de la PCR empleado para la amplificación de los genes que codifican para la toxina Hlg- γ .

Los amplicones obtenidos, de 560 pb para los genes *pvl*, y 535 pb para los genes *hlg-γ* se observaron tras realizar una electroforesis horizontal del modo descrito en el apartado anterior.

2.3.6 Confirmación de genes mediante secuenciación

Algunos de los amplicones obtenidos mediante las reacciones de PCR explicadas en los apartados previos (*femB*, *ileS2*, *mecA*, *pvl* y *hlg-γ*), fueron elegidos arbitrariamente para su secuenciación, con el fin de verificar una correcta amplificación. Para la purificación de estos productos de PCR se procedió a la realización del siguiente protocolo de purificación manual, adecuado para amplicones de tamaño superior a 250 pb:

1. Mezclar 45 µl del producto de amplificación con 30 µl de polietilenglicol (PEG) (1,46 g de NaCl, 2 g de PEG 8.000 y hasta 1 ml de agua) en un tubo de 1.5 ml.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 r.p.m.
3. Retirar el líquido con una pipeta de cristal inmediatamente después, teniendo cuidado de no introducir líquido ni aire en el tubo.
4. Añadir 100 µl de etanol frío al 70%.
5. Precipitar el ADN mediante centrifugación a 13.000 r.p.m., durante 5 minutos.
6. Retirar el líquido de la misma forma que la indicada en el paso 3.
7. Secar el tubo en el evaporador Concentrator 5301 (eppendorf, Germany) a 45° C.

Posteriormente el ADN fue resuspendido en 10 µl de agua estéril. La cantidad y la calidad de los productos de purificación obtenidos se comprobaron, tanto mediante electroforesis horizontal según se describió en el apartado 2. 3. 5, como mediante espectrofotometría en el NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se consideró como adecuada una cantidad de ADN superior a 30 ng y un cociente 260/280 de 1.8-2.

La secuenciación se llevó a cabo mediante el método de terminación de la cadena empleando dideoxirribonucleótidos³²², utilizando el kit *Big Dye Terminator v.3.1. Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Estados Unidos). Con este kit las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µl, añadiendo entre 30 y 100 ng de ADN molde, 1 µl del tampón de reacción 2.5X, 1µl de reactivo *Big Dye Terminator* y 1 µM del cebador correspondiente, teniendo en cuenta que para cada fragmento se realizarán dos reacciones de secuenciación, una con cada cebador. Se emplearon las condiciones de amplificación recomendadas por el fabricante, representadas en la Figura 2. 16.

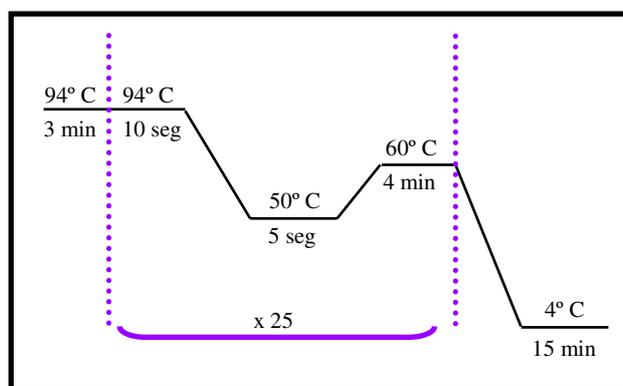


Figura 2. 16. Esquema del programa empleado para realizar las reacciones de secuenciación de los genes *femB*, *ileS2*, *mecA*, *pvl* y *hlg-γ*, válido además para todos los fragmentos de genes secuenciados en esta tesis doctoral.

Los productos obtenidos de la reacción de secuenciación fueron purificados, para eliminar los dideoxirribonucleótidos trifosfatos marcados con fluorescencia no incorporados, mediante el siguiente protocolo manual de limpieza con etanol:

1. Añadir 15 µl de agua estéril a los 5 µl de la reacción de secuenciación.

Finalidad: Emplear volúmenes que disminuyan la probabilidad de pérdida de reacción de secuenciación derivada del manejo de volúmenes muy pequeños.

2. Mezclar en un tubo de 1.5 ml la reacción de secuenciación con 80 µl de etanol al 80%.
3. Centrifugar durante 20 minutos a 14.000 r.p.m.
4. Retirar de forma inmediata el sobrenadante mediante volcado del tubo.
5. Añadir 200 µl de etanol al 70%.

6. Centrifugar durante 5 minutos a 14.000 r.p.m.
7. Retirar el sobrenadante de la forma indicada en el paso 4.
8. Secar el tubo en el evaporador Concentrator 5301 (Eppendorf, Germany) a 45° C.

De modo alternativo, se empleó el kit *Dyex 2.0 Spin* (Qiagen, Alemania) para dicha purificación, según las instrucciones del fabricante.

Los productos purificados de las reacciones de secuenciación se mantuvieron a -20° C hasta proceder a la secuenciación propiamente dicha, momento en el que se le añadieron 12 µl de formamida y fueron introducidos en el secuenciador automático ABI PRISM 310 o en el analizador automático ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, Estados Unidos). Las secuencias obtenidas fueron visualizadas, revisadas y corregidas mediante el programa informático *DNA Sequencing Analysis* versión 3.7 (Applied Biosystems, Estados Unidos). Las dos secuencias obtenidas para cada gen fueron alineadas utilizando el programa informático BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*), obteniendo una única secuencia consenso. Este programa fue empleado desde el servidor NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Cada secuencia consenso obtenida fue comparada con las secuencias depositadas en la base de datos del *GenBank*, que es la base de datos de secuencias genéticas del NIH (del inglés *National Institutes of Health*) de Estados Unidos, consultada también a través del servidor NCBI.

2.3.7 Determinación de la localización del gen *ileS2*

El gen *ileS2* codifica una enzima isoleucil-ARNt sintetasa, la cual hace que los aislados que lo portan sean resistentes a altas concentraciones de mupirocina. Frecuentemente este gen ha sido detectado en plásmidos presentes en cepas de *S. aureus*, aunque también ha sido localizado en alguna ocasión en el ADN cromosómico, siendo relacionado en este caso con resistencia a bajas concentraciones del antibiótico.

Para determinar cuál es la localización del gen *ileS2* en nuestros aislados SARM-AC, que mediante la PCR descrita en el apartado 2. 3. 5 resultaron positivos para ese gen, se realizó el método denominado *Southern blot*.

La primera parte de esta técnica consistió en realizar la extracción plasmídica de los aislados de interés, empleando el kit *QIAprep Spin Plasmid* (Qiagen, Alemania). Debido a que el protocolo recomendado por el fabricante de este kit es general para cualquier tipo de bacteria, fue adaptado para *S. aureus* quedando finalmente del siguiente modo:

1. De un cultivo de *S. aureus* en placas BHIA resuspender una colonia aislada en 10 ml de medio LB a 37° C y 175 r.p.m. durante 6 horas.

Finalidad: Ha sido previamente determinado que estas condiciones son las adecuadas para obtener un crecimiento lo suficientemente alto para obtener una cantidad de plásmido apreciable, y lo suficientemente bajo para que no se haya producido aún un engrosamiento tal de la pared celular que dificulte la lisis de la bacteria.

2. Traspasar todo el cultivo bacteriano en tubos Beckman de 40 ml y centrifugar a 5400 g durante 10 minutos a 4° C en la centrífuga Avanti™ J-30I (Beckman Coulter, Estados Unidos).
3. Retirar el sobrenadante y resuspender suavemente el precipitado en 950 µl de tampón de lisis, P1.

*Finalidad: Recoger toda la población bacteriana eliminando el medio de cultivo con el material extracelular que *S. aureus* produce.*

- Transferir 475 μ l a dos tubos de 1.5 ml y añadir 25 μ l de una solución de lisostafina a 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Finalidad: Evitar la saturación en el mismo tubo de sustancias de naturaleza viscosa procedentes de la lisis celular.

- Añadir 250 μ l de tampón P2 e invertir suavemente el tubo de 4-6 veces para mezclar.
- Añadir 350 μ l de tampón N3 e invertir suave e inmediatamente el tubo de 4-6 veces.
- Centrifugar 10 minutos a 13.000 r.p.m.
- Añadir a la columna *QIAprep Spin* todo el sobrenadante que podamos recuperar del paso anterior, poniendo especial cuidado en no recoger nada de la sustancia viscosa que compone el precipitado.

Finalidad: Pasar por la columna únicamente el contenido genómico, descartando todo el residuo procedente de la lisis bacteriana.

- Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 60 segundos y descartar el contenido el tubo colector.
- Lavar la columna añadiendo 0.5 ml de tampón PB.

Finalidad: Eliminar la actividad de las nucleasas celulares.

- Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 60 segundos y descartar el contenido el tubo colector.
- Lavar la columna añadiendo 750 μ l de tampón PE.
- Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 60 segundos y descartar nuevamente el contenido del tubo colector.
- Centrifugar adicionalmente otros 60 segundos a 13.000 r.p.m.

Finalidad: Eliminar cualquier residuo de tampón de lavado, ya que los residuos de etanol que contiene el tampón PE pueden inhibir reacciones enzimáticas posteriores.

- Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml nuevo y añadir 50 μ l del tampón de elusión, denominado por el fabricante EB, previamente calentado a 70° C.

16. Dejar reposar un minuto y centrifugar 60 segundos a 13.000 r.p.m.

El análisis de la extracción plasmídica se realizó mediante electroforesis horizontal, de igual forma que en los apartados anteriores para comprobar los productos de PCR obtenidos. Sin embargo, debido al gran tamaño que pueden poseer algunos plásmidos, la electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0.7%, cuya reticulicidad favorece su avance. La determinación de los tamaños aproximados de los plásmidos fue calculada en comparación con los tamaños conocidos del marcador de peso molecular II (Roche Diagnostics, Suiza).

Posteriormente, los perfiles plasmídicos fueron transferidos desde los geles de agarosa a membranas de nylon siguiendo los procedimientos previamente descritos³²³. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Cortar la membrana de nylon Zeta-Probe®GT (Bio-Rad, Estados Unidos), cargada positivamente, y papel Whatman 3MM un centímetro por cada lado mayor que el tamaño del gel y humedecerlos en SSC 2X (preparado a partir de una solución de SSC 20 X: 3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico, pH 7).
2. Depositarlo en la unidad de transferencia Vacuum Blotter modelo 785 según las condiciones del fabricante.
3. Encender la bomba de vacío a 50 mbares.
4. Cubrir toda la superficie del gel con solución depurinizante (0.25 N HCl) y dejar 20 minutos, no dejando que el gel se quede sin solución en ningún momento.
5. Retirar la solución y volver a cubrir la superficie del gel con solución desnaturalizante (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH) durante 20 minutos.
6. Retirar la solución desnaturalizante y cubrir el gel con la solución neutralizante (1.5 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA) durante 25 minutos.
7. Retirar la solución neutralizante y volver a cubrir la superficie del gel con SSC 10X durante 30-60 minutos.
8. Retirar toda la solución y apagar la bomba de vacío.
9. Retirar el gel transferido y comprobar la eficiencia de la transferencia mediante una nueva tinción con bromuro de etidio y visualización en el GelDoc 2000 (Bio-rad, Estados Unidos).

10. Colocar la membrana sobre papel Whatman e inmovilizar las bandas mediante la aplicación de 1200 pulsos de luz ultravioleta en el UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, Estados Unidos).

Las membranas con los plásmidos transferidos fueron guardadas secas a 4° C para su posterior hibridación.

Las hibridaciones fueron realizadas empleando sondas marcadas con digoxigenina (DIG). Para la creación de estas sondas altamente sensibles fue empleado del kit *PCR DIG Probe Synthesis* (Roche, Suiza). Este sistema emplea la amplificación mediante una *Taq* ADN polimerasa que incorpora nucleótidos de uridina marcados con DIG. Las reacciones fueron llevadas a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, empleando como molde el fragmento de ADN del gen *ileS2* obtenido mediante PCR como fue expuesto en el apartado 2. 3. 5, y purificado según lo explicado en el apartado 2. 3. 7. En las reacciones de PCR se incluyó un control de la amplificación del fragmento sin marcar, un control positivo incluido en el kit y un control negativo sin ADN. Los productos de estas reacciones fueron visualizados del modo explicado en el apartado 3. 2. 5. Comprobamos que el marcaje se ha realizado correctamente si observamos un retraso en el avance de la banda de *ileS2* marcada con respecto al control que introdujimos sin marcar.

El último paso del análisis *Southern blot* es la hibridación de las membranas de nylon con la sonda marcada del gen *ileS2*, y su detección mediante el kit *DIG Luminiscent Detection* (Boehringer Mannheim, Alemania)³⁵⁷. En la detección se emplean anticuerpos anti-DIG, cuya región Fab o de unión al antígeno se encuentra conjugada a la fosfatasa alcalina. El sustrato de dicha enzima es el CSPD, que al ser añadido hace que ésta se desfosforile, lo cual produce una emisión a 477 nm que puede ser recogida en una película de rayos X. Este proceso se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo:

1. Calentar a 65° C la solución de prehibridación, compuesta por SSC 6 X, solución de Denhardt 5 X, Dodecilsulfatosódico (SDS) 0.5%, formamida deionizada 50 %, ADN de esperma de arenque 50 µg/ml. La solución de Denhardt se añade a partir de una solución a 100X (blot-qualified BSA o albúmina de suero bovino 2 %, ficoll 2%, polivinilpirrolidona 2%). El ADN de esperma de arenque se debe desnaturalizar previamente calentándolo 5 minutos a 100° C y enfriarlo rápidamente en etanol/hielo.

2. Introducir la membrana en un tubo de hibridación de vidrio (Stuart Scientific, Reino Unido) con la cara donde se encuentra el ADN hacia el interior.
3. Mojar la membrana con SSC 2X y descartar la solución.
4. Añadir 40 ml de la solución de prehibridación e incubar en el horno de hibridación (Stuart Cientific, Reino Unido) de 2-4 horas a 65° C y 45 giros por minuto.
5. Descartar la solución de prehibridación y añadir 10 ml de solución de hibridación (10 ml de solución de prehibridación más 25 ng/ml de la sonda *ileS2*). Incubar toda la noche a 42° C y 45 giros por minuto.
6. Recoger la solución de hibridación en un tubo estéril y guardar a – 20° C.
7. Lavar la membrana 2 veces durante 5 minutos cada vez con 100 ml de solución de lavado 2X (SSC 2X, SDS 0.1%) con la misma agitación.
8. Lavar la membrana 2 veces durante 15 minutos cada vez con 100 ml de solución de lavado 0.5 X (SSC 0.5X, SDS 0.1%) a 68° C y la misma agitación.
9. Lavar nuevamente la membrana 5 minutos con 100 ml de solución de lavado de ácido maleico (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.3%; pH 7.5), manteniendo la agitación.
10. Incubar 30 minutos con 100 ml de solución de bloqueo 1X (preparada a partir de la solución de bloqueo 10X: agente bloqueante 10%, ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M; pH 7.5).
11. A partir de este paso, continuar con las recomendaciones del fabricante para el empleo del kit de detección *DIG Luminiscent Detection* (Boehringer Mannheim, Alemania)³⁵⁷.

2.3.8 Análisis de expresión del gen *ileS2*

Para el análisis de expresión del gen *ileS2* se seleccionaron 11 cepas de esta colección de SARM-AC, en las que previamente se había confirmado la resistencia a altas concentraciones de mupirocina mediante la amplificación del gen *ileS2*, y la localización plasmídica de éste, más una cepa sin el gen *ileS2*, incluida como control negativo. Estas cepas fueron elegidas de forma que hubiera representantes de distintos linajes genéticos, así como

pertenecientes a dos fenotipos diferentes observados de resistencia a altas concentraciones de mupirocina.

A partir de colonias aisladas en BHIA de cada aislado, se sembraron en medio líquido BHI a 37° C y 150 r.p.m. Los cultivos se pararon en fase de crecimiento exponencial, cuando, al medir diluciones 1/10 de cada uno en el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, Estados Unidos) a 620 nm, alcanzaron una densidad óptica de 0.6. Para bloquear la expresión del ARN, a 1 ml de cultivo se le añadieron 2 ml de *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (Qiagen, Alemania). Este reactivo se introduce en las células bacterianas estabilizando y protegiendo el ARN expresado. Esta mezcla fue centrifugada 10 minutos a 5000 g, y se procedió a la extracción del ARN a partir del sedimento obtenido en dicha centrifugación. La extracción de ARN se realizó empleando el kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo un paso de lisis, mediante la adición de 25 µl de una solución de lisostafina a 1 mg/ml, previo a la digestión por proteinasa K. El rendimiento de la extracción fue medido por espectrofotometría en el NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos). A continuación, se prosiguió a la purificación manual de los ARN mediante un tratamiento con DNasa, del siguiente modo:

1. Diluir los ARN hasta un volumen de 50 µl con agua/DEPC (Diethyl-pirocarbonato).
2. Añadir 50 µl de una mezcla 2X de DNasa: Tris-Cl 80 mM pH 8.3, MgCl₂ 12 mM, 0.1 U/µl de DNasaI, 0.2 U/µl de inhibidor de las RNasas (New England Biolabs, Reino Unido).
3. Mezclar e incubar a 37° C durante 10 minutos.
4. Añadir 20 µl de acetato sódico 2 M pH 4 y mezclar.
5. Añadir 60 µl de fenol ácido y agitar.

Finalidad: Desnaturalizar y solubilizar las proteínas.

6. Añadir 60 µl de cloroformo puro y agitar muy bien.

Finalidad: Separar las distintas fases de la mezcla en la posterior centrifugación.

7. Centrifugar 15 minutos a 10.000 r.p.m. y retirar el sobrenadante a un nuevo tubo.

8. Añadir 120 µl de cloroformo puro y centrifugar 3 minutos a 10.000 r.p.m.
9. Retirar el sobrenadante, añadir 120 µl de isopropanol y agitar.
10. Dejar en hielo toda la noche.
11. Centrifugar 12 minutos a 10.000 r.p.m. y descartar sobrenadante.

Finalidad: Precipitar al ARN.

12. Lavar el precipitado con 120 µl de etanol al 75% a temperatura ambiente y centrifugar 3 minutos a 10.000 r.p.m.
13. Dejar secar a temperatura ambiente y resuspender en 28 µl de agua/DEPC.

Los ARN purificados fueron nuevamente medidos en el NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos) y, posteriormente, analizados en el sistema automático de electroforesis *Experion* (Bio-rad, Estados Unidos). Con estas dos medidas confirmamos la concentración de ARN obtenida, así como su pureza y su posible contaminación con ADN. Se consideraron ARN puros para continuar el estudio aquellos que presentaron una concentración superior a 20 ng/µl, un cociente 260/280 comprendido entre 1.8-2.2, y que no mostraron bandas de gran tamaño correspondientes al ADN.

A continuación se realizó la reacción de retrotranscripción empleando el kit de síntesis de ADNc *iScriptTM* (Bio-rad, Estados Unidos), empleando como molde 100 ng de ARN.

Para la realización de la PCR en tiempo real o RT-qPCR se eligió el gen constitutivo *gmk* como control endógeno de la reacción. Este gen, que codifica para la enzima guanilato kinasa, forma parte del grupo de genes constitutivos que se incluyen en el análisis *MultiLocus Sequence Typing* (MLST), y entre ellos, es el que presenta menor número de alelos distintos descritos en este momento (<http://www.mlst.net>). Las parejas de cebadores para el gen de estudio y el gen control se diseñaron de manera que su longitud máxima estuviera comprendida entre 15-25 nucleótidos, con una T_m de 58-60° C y dieran lugar a un amplicón de entre 50 y 150 pb. Para ello se emplearon como referencia las secuencias publicadas en la base de datos del MLST, y el programa primer3 (<http://simgene.com/Primer3>). Las secuencias de ambas parejas de cebadores se encuentran recogidas en la Tabla 2. 10 en el Anexo 2. 8. 2.

Para las reacciones en tiempo real se empleó el agente intercalante *SYBR Green* (Bio-rad, Estados Unidos) y el equipo *iCycler*TM (Bio-rad, Estados Unidos). Se optimizaron las condiciones de hibridación mediante una rampa de temperaturas, estableciendo el programa representado en la Figura 2.17.

1 ciclo	1 repetición	Activación	95° C	5 min	
2 ciclo	45 repeticiones	Desnaturalización	95° C	30 seg	
		Hibridación	53° C	30 seg	
		Extensión	72° C	30 seg	
3 ciclo	1 repetición	Desnaturalización	95° C	1 min	
4 ciclo	1 repetición	Hibridación	53° C	1 min	
5 ciclo	85 repeticiones	Disociación	95° C	10 seg	-0.5 

Figura 2. 17. Representación del programa de amplificación de la PCR en tiempo real. Las posiciones de las cámaras de fotos ilustran los puntos de toma de datos.

A continuación, se mezclaron los ADN complementarios (ADNc) obtenidos de los 11 aislados *ileS2*⁺, y a partir de una dilución 1/10 de estos, se realizaron diluciones seriadas tomando la inicial como 1, y a partir de ahí, 1/10, 1/100 y 1/1000. Estos ADNc se emplearon como molde para las reacciones de PCR en tiempo real, comprobando que las eficiencias de los cebadores de los dos genes incluidos en el estudio, *ileS2* y *gmk*, son similares y se encuentran en el rango de 90-110%. Además, a partir de las curvas de amplificación obtenidas se eligió aquella dilución que presentó el Ct (del inglés *threshold Cycle*) más adecuado. Finalmente, se procedió a los experimentos con las muestras SARM-AC, donde cada muestra se analizó por triplicado para cada gen, incluyendo una muestra de referencia en cada placa. Se empleó como muestra de referencia el ADNc empleado en las diluciones seriadas, también por triplicado.

En el análisis de los resultados se empleó el método de cuantificación relativa basado en el cálculo del $\Delta\Delta Ct$. Con este método comparamos directamente los Cts del gen *ileS2* con los del gen control, *gmk*, en cada muestra, lo que se denomina ΔCt ; para, posteriormente, comparar los ΔCt de las muestras experimentales con respecto a una de las muestras tomada como referencia, lo que se denomina $\Delta\Delta Ct$. A partir de este dato, se puede obtener el número de veces más o de veces menos que se expresa el gen de estudio³⁵⁸.

Empleando el test estadístico no paramétrico Mann-Whitney, se estudió si existían diferencias de expresión del gen *ileS2* entre los dos fenotipos de resistencia a altas concentraciones de mupirocina observados.

2.3.9 Identificación mediante PCR del tipo estructural de SCC_{mec}

El tipo estructural del SCC_{mec} se determinó para cada aislado mediante una PCR múltiple descrita previamente³⁵⁹. A pesar de que hoy en día existe una amplia variedad de tipos de SCC_{mec}, esta estrategia permite la identificación de los tipos más frecuentes: I, II, III y IV; así como las variantes IA, IIIA, IIIB y IVA. La PCR está basada en la detección de 8 *loci* (A-H) seleccionados en base a las secuencias del *mec* previamente descritas (Tabla 2. 2)^{121,127,128}, incluyendo además, la amplificación del gen *mecA* como control interno positivo. Como vemos en las Figura 2. 19 y Figura 2. 20, cada tipo de casete va a contener alguno o algunos de los 8 *loci* descritos, por lo que el número y el tamaño de bandas obtenidas para cada uno nos va a indicar qué tipo de SCC_{mec} posee cada aislado. Las secuencias de los cebadores se encuentran recogidas en la Tabla 2. 11 del Anexo 2. 8. 2.

La PCR fue realizada en un volumen final de 25 μ l, conteniendo el tampón de reacción al 1X, dNTP 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, los cebadores CIF2 F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 y pT181 R1 a una concentración de 400 mM, los cebadores DCS F2, DCS R2, MECA P4, MECA P7 e IS431 P4 a 800 mM, KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 y RIF4 R9 a 200 mM, 1.25 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido) y 1 μ l de ADN molde. El programa de amplificación fue el representado en la Figura 2.18.

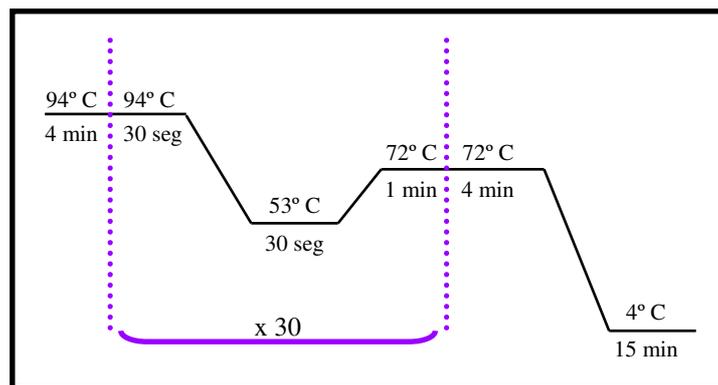


Figura 2. 18. Esquema del programa de amplificación empleado para la determinación del tipo de SCCmec según la estrategia de Oliveira³⁵⁹.

Tabla 2. 2. Dianas génicas específicas y tamaño de los amplicones obtenidos en los diferentes tipos de SCCmec según la estrategia de Oliveira³⁵⁹.

<i>Locus</i>	Cebadores	Tamaño de banda (pb)	Tipo de SCCmec
A	CIF2 F2 / CIF2 R2	495	I
B	KDP F1 / KDP R1	284	II
C	MECI P2 / MECI P3	209	II, III
D	DCS F2 / DCS R1	342	I, II, IV
E	RIF4 F3 / RIF4 R9	243	III
F	RIF5 F10 / RIF5 R13	414	III
G	IS431 P4 / pUB110 R1	381	IA, IVA
H	IS431 P4 / pT181 R1	303	IIIA
<i>mecA</i>	MECA P4 / MECA P7	162	Control interno

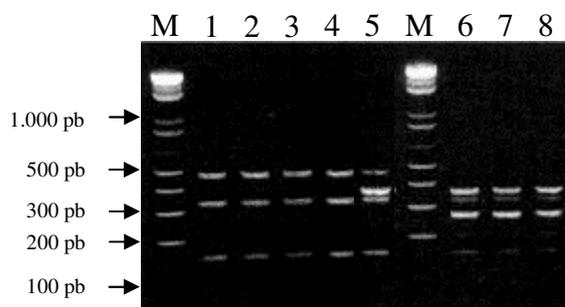


Figura 2. 19. Amplificación de los tipos de SCCmec I y II según el método de Oliveira³⁵⁹. Carriles del 1-4 corresponden con el SCCmec tipo I y el carril 5 con su variante IA. Los carriles del 6-8 corresponden con el SCCmec tipo II.

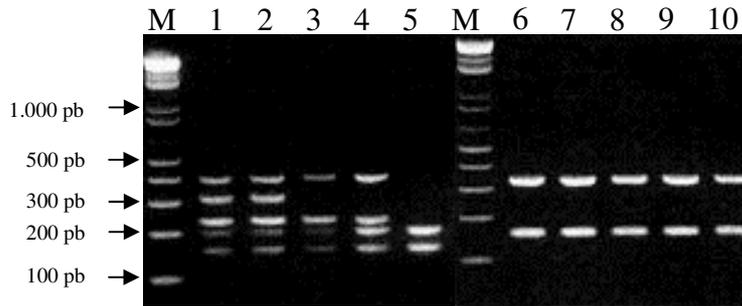


Figura 2. 20. Amplificación de los tipos de SCCmec III y IV según el método de Oliveira³⁵⁹. Carriles 1 y 2 corresponden con el SCCmec tipo III, 3 y 4 con su variante IIIA y 5 con su variante IIIB. Carriles del 6-10 corresponden con el SCCmec tipo IV.

No obstante, este método no identifica adecuadamente el SCCmecIV, casete típico de aislados SARM comunitarios, ya que su detección se basa únicamente en la amplificación del locus D, también presente en los tipos I y II^{128,129}. Además de que no permite diferenciar el SCCmec tipo IV del V, también descrito típicamente en SARM-AC. Por ese motivo, con los aislados en los que previamente se detectó el SCCmecIV, fue empleada otra estrategia de PCR descrita por Milheiriço *et al.*, con la que solventar dichas cuestiones. Esta técnica está basada la amplificación del complejo génico *ccr*, el cual codifica las recombinasas implicadas en la movilidad del elemento³⁶⁰. Esta estrategia, que en realidad es una actualización de la anterior, elimina la amplificación de los plásmidos linearizados pUB110 y pT181 e incluye 4 parejas de cebadores para la detección del *ccrB*, específico para los tipos II y IV; del *ccrC*, específico para el tipo V; la región J1 del tipo III; y la región J1 del tipo V (Tabla 2. 3). Obteniendo, nuevamente patrones de bandas que permitirán diferenciar entre los casetes IV y V (Figura 2. 21). Las secuencias de los mismos se encuentran recogidas en la Tabla 2. 11 del Anexo 2. 8 .2.

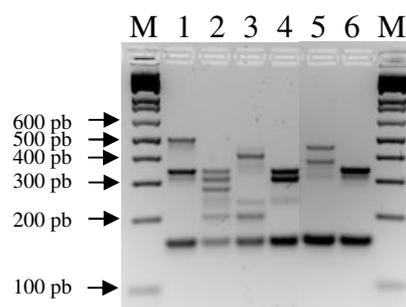


Figura 2. 21. Amplificación de los tipos de SCCmec según el método de Milheiriço *et al.*³⁶⁰. Los carriles del 1-6 corresponden con los SCCmec I-VI, respectivamente.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl con tampón de PCR 1 X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 2 mM, 0.2 µM de los cebadores KDP F1 y KDP R1, 0.4 µM de los cebadores CIF2 F2, CIF2 R2, RIF5 F10, RIF5 R13, SCCmec III J1 F, SCCmec III J1 R, SCCmec V J1 F y SCCmec V J1 R, 0.8 µM de los cebadores MECI P2, MECI P3, DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7, ccrB2 F2, ccrB2 R2, ccrC F2 y ccrC R2, 1.25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido) y 1 µl de ADN molde. Ningún cambio se realizó en cuanto al programa de amplificación.

Tabla 2. 3. Dianas génicas específicas y tamaño de los amplicones obtenidos en los diferentes tipos de SCCmec según la estrategia de Milheiriço³⁶⁰.

<i>Locus</i>	Cebadores	Tamaño de banda (pb)	SCCmec
A	CIF2 F2 / CIF2 R2	495	I
complejo <i>ccr</i>	ccrC F2 / ccrC R2	449	V
F	RIF5 F10 / RIF5 R13	414	III
region J1	SCCmec V J1 F / SCCmec V J1 R	377	V
D	DCS F2 / DCS R1	342	I, II, IV, VI
complejo <i>ccr</i>	ccrB2 F2 / ccrB2 R2	311	II, IV
B	KDP F1 / KDP R1	284	II
Región J1	SCCmec III J1 F / SCCmec III J1 R	243	III
C	MECI P2 / MECI P3	209	II, III
<i>mecA</i>	MECA P4 / MECA P7	162	control interno

2.3.10 Métodos de tipificación molecular

2.3.10.1 Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Como hemos visto en el capítulo 1, la electroforesis en campo pulsado combinada con endonucleasas de baja frecuencia de corte³⁶¹, es la técnica por excelencia en la tipificación molecular de *S. aureus* en epidemiología local³⁶²⁻³⁶⁴. El método consiste en eliminar todos los componentes celulares, hasta obtener puro el ADN genómico completo. Debido a su tamaño, este ADN en solución acuosa tiende a fracturarse al azar de forma mecánica, por lo que para evitarlo, todos los pasos se realizan con el ADN embebido en un bloque de agarosa. Para llevar a cabo esta técnica se realizó el siguiente protocolo:

1. Inocular cada aislado en 5 ml de medio líquido LB e incubar toda la noche a 37° C en agitación a 150 r.p.m.

Finalidad: Obtener la concentración celular adecuada.

2. De los 5 ml separar 500 µl en un tubo de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 4 minutos.
4. Descartar el sobrenadante por inversión del tubo.

Finalidad: Eliminar los restos de medio de cultivo, productos de desecho y material extracelular que produce la bacteria.

5. Resuspender el sedimento de células en 200 µl de tampón de suspensión (Tris 10 mM; NaCl 20 mM; 50 mM EDTA; pH 7,2).
6. Ajustar la concentración de las suspensiones celulares a un valor de absorbancia de entre 0.9 y 1.1, medida a una densidad óptica de 620 nm en el espectrofotómetro SmartSpecTM 3000 (Bio-Rad, Estados Unidos).

Finalidad: Igualar las concentraciones de manera que cada inserto tenga la misma carga celular.

7. Pasar 150 µl de las suspensiones celulares del tubo anterior a tubos de 1.5 ml nuevos.
8. Equilibrar los 150 µl de suspensión 10 minutos a 50° C.

Finalidad: Atemperar las células ya que en el siguiente paso se les añadirá agarosa que estará aproximadamente a esa temperatura, facilitando la homogeneización de la mezcla.

9. Añadir 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad, Estados Unidos) preparada al 2% en TBE 0,5X, quedando una proporción 1:1, suspensión celular:agarosa.

Finalidad: Obtener bloques de agarosa a una concentración de agarosa del 1%.

10. Homogeneizar suavemente y dispensar en los moldes correspondientes (Bio-Rad, Estados Unidos), dejándolas solidificar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Pasado ese tiempo, desmoldar e introducir en tubos estériles de propileno a los que previamente se añadió 1 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM; 50 mM NaCl; 0,2% deoxicolato sódico; 0,5% laurilsarcosina sódica; 50 µg/ml lisostafina; pH 7,2) e incubar en la estufa a 37° C durante 12-16 horas.

Finalidad: Producir la lisis de la pared celular de la bacteria.

12. Transcurrido ese tiempo, retirar el tampón de lisis y lavar dos veces con agua estéril.
13. Añadir posteriormente 1 ml de tampón de proteinasa K (EDTA 100 mM, pH 8; 0,2% deoxicolato sódico; laurilsarcosina 1%; proteinasa K 1 mg/ml) e incubar 48 horas en una estufa a 50° C.

Finalidad: Producir la rotura de las proteínas que se encuentran tanto en la membrana celular como en el interior celular.

14. Transcurrido ese tiempo, retirar el tampón de la proteinasa K y hacer tres lavados de aproximadamente una hora cada uno en agitación suave con tampón de lavado 1X (Tris 2 mM; 5 mM EDTA; pH 8).

Finalidad: Eliminar completamente la proteinasa K para reducir al mínimo la probabilidad de que actúe también sobre la enzima de restricción que será añadida a continuación.

15. Para la digestión enzimática, cortar un tercio de un inserto y equilibrarlo en tampón de restricción una hora a 25° C.

Finalidad: Equilibrar el inserto con el tampón de restricción de forma que la enzima penetre más fácilmente en el inserto.

16. Posteriormente, añadir 10 unidades de *Sma*I (Promega, Estados Unidos) durante 12 horas a 25° C. *Sma*I es una enzima de baja frecuencia de corte cuya secuencia diana es 5'-CCC↓GGG-3'.

Finalidad: Digerir el ADN cromosómico para poder comparar patrones de restricción.

Los insertos restantes sin digerir se conservaron en tampón de lavado 1X a 4° C.

Para llevar a cabo la electroforesis, porciones de 2-3 mm de los insertos digeridos se introdujeron en los pocillos de geles de agarosa certificada para campo pulsado (Bio-Rad, Estados Unidos) preparados al 1% en TBE 0,5 X (45 mM Tris; 45 mM ácido bórico; 1 mM de EDTA; pH 8,3). Los geles se sumergieron en el tanque del aparato CHEF-DRIII (Bio-Rad, Estados Unidos), habiéndole añadido previamente 2 litros de tampón TBE 0,5 X, que se mantuvieron circulando a 80 r.p.m. y a una temperatura de 11.3° C. Las condiciones de electroforesis consistieron en una rampa inicial de pulsos de 0,5 a 35,0 segundos durante 28,5 horas y una segunda rampa de pulsos de 0,1 a 0,5 segundos durante 5 horas, para la adecuada separación de los fragmentos más ligeros. Ambas rampas mantuvieron un voltaje de 200 voltios (6 voltios/cm), y un ángulo de orientación de 120°. Este sistema de campo pulsado es el más extendido, dispone de 24 electrodos dispuestos periféricamente por la fuente de electroforesis, de manera que se crea un gradiente constante a lo largo de todo el gel que consigue separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos (Figura 2. 22).



Figura 2. 22. Gel en el interior de la cubeta del sistema CHEF de electroforesis de campo pulsado. El ángulo de 120° indicado, es el ángulo de reorientación del campo eléctrico entre los diferentes lados del hexágono en el que están distribuidos los electrodos.

Concluida la electroforesis, los gels fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de $0,5 \mu\text{g/ml}$ durante 1 hora, y se lavaron para eliminar los restos de bromuro de etidio en TBE $0,5\text{X}$ durante 30 minutos.

Los gels se visualizaron y se fotografiaron bajo luz ultravioleta empleando el sistema GelDoc 2000 (Bio-Rad, Estados Unidos). Las imágenes fueron exportadas en formato TIFF para su análisis con el programa informático *InfoQuest* (Bio-Rad, Estados Unidos).

Con el fin de normalizar los patrones de macrorrestricción obtenidos, en cada gel se reservaron de 2 a 3 carriles con la cepa de referencia *S. aureus* NCTC 8325 (Tabla 2. 1). Esta cepa recibió el mismo tratamiento que las demás cepas del estudio y fue usada como marcador ya que el tamaño de los fragmentos originados de la digestión de esta cepa tipo está bien definido. Durante la comparación de los patrones de macrorrestricción se fijó una tolerancia del 1% en la posición de las bandas. Para el cálculo de la similitud entre cada par de aislados del estudio se empleó el coeficiente de Dice (S_D), que compara la presencia o ausencia de cada banda en cada uno de los dos aislados. La matriz de similitud es calculada de manera automática por el programa informático y expresada según el método UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), de la forma explicada en el capítulo 1. Se consideraron el mismo clon, aquellos aislados que mostraron las mismas bandas, y subtipos dentro de dicho clon aquellos que mostraron hasta 6 bandas de diferencia o hasta un mínimo de 80% de homología³⁶⁵. Los tipos se representan con letras mayúsculas (p. ej. A, B, C...), desde el tipo más numeroso al menos, al igual que se hizo con los subtipos

dentro de un tipo, que se denominaron con números arábigos desde el más numeroso al menos (p. ej. A1, A2, A3...).

2.3.10.2 Análisis de repeticiones en tándem en número variable en varios loci

Como vimos en el capítulo 1, el análisis de repeticiones en tándem en número variable en varios loci o MLVA (del inglés *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*) es una estrategia de PCR múltiple basada en la amplificación de los denominados VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) de 7 genes distintos. La combinación de las 7 bandas nos ofrece un patrón que nos permite hacer comparaciones entre distintos aislados. Para *S. aureus* esta técnica fue descrita en 2003³⁶⁶ y optimizada en nuestro laboratorio, tal como se expuso en el capítulo 1³⁶⁷.

Igual que en el caso del PFGE, las imágenes del MLVA se visualizaron y se fotografiaron bajo luz ultravioleta empleando el sistema GelDoc 2000 (Bio-Rad, Estados Unidos), y fueron exportadas en formato TIFF para su análisis con el programa informático *InfoQuest* (Bio-Rad, Estados Unidos). El análisis se realizó igual que en el apartado anterior, empleando el S_D , con una tolerancia del 1% y expresando los resultados mediante UPGMA. Los aislados de cada tipo fueron nombrados con letras minúsculas para diferenciarlos de los grupos obtenidos por PFGE. Cada tipo diferente se nombró con una letra minúscula del abecedario, manteniendo los tipos descritos en el capítulo 1.

2.3.10.3 Tipificación *spa*

La tipificación *spa*, o *spa typing*, es una técnica basada en la amplificación de la región polimórfica del gen que codifica para la proteína A. Esta región, denominada X, está formada por 24 pb repetidas un número de veces variable³⁶⁸, y se encuentra localizada corriente arriba de la secuencia que codifica para la región del extremo carboxilo terminal de la proteína, la cual está encargada del anclaje a la pared celular^{369,370}. La región repetida parece que debe servir para extender la región del extremo amino terminal de unión a la IgG a través de la pared celular³⁷¹. Por lo tanto, la región X se encuentra rodeada por secuencias

altamente conservadas, lo que ha permitido el diseño de cebadores específicos que permiten la amplificación entera de esta región³⁶⁸, recogidos en la Tabla 2. 12 del Anexo 2. 8. 2. (Figura 2. 23).

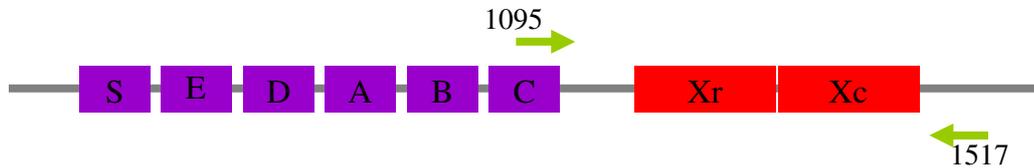


Figura 2. 23. Representación de gen *spa*. Los rectángulos muestran las regiones codificantes del gen. De la A a la D corresponde con la región de unión a la IgG. La zona roja muestra el extremo carboxilo terminal que está formado por Xr, donde se encuentran incluidas las repeticiones, y Xc, que corresponde con la secuencia de anclaje a la pared celular. Las flechas verdes indican las zonas de hibridación de los cebadores.

La mezcla de PCR estaba compuesta por tampón de reacción al 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 2 mM, 0,4 μM de cada uno de los cebadores 1095F y 1517R, y 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido). El programa de amplificación del gen *spa* es el representado en la Figura 2. 24.

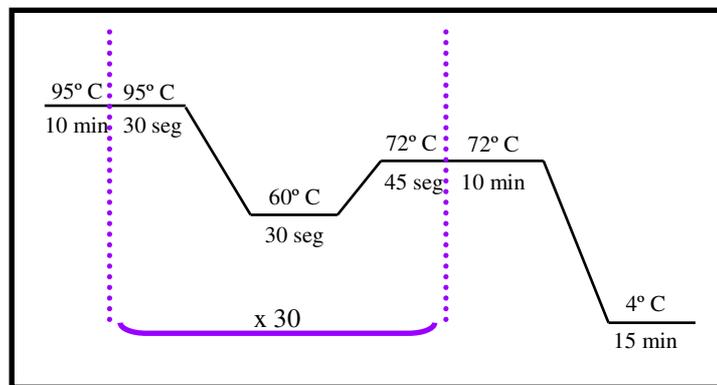


Figura 2. 24. Programa de amplificación del gen *spa*.

Los productos de PCR fueron visualizados, purificados y preparados para secuenciar de la forma descrita en los apartados 2. 3. 5. y 2. 3. 6.

Las variaciones en la región X son debidas tanto a mutaciones puntuales, como a pérdidas y ganancias de repeticiones. Cada repetición tiene asignado un código alfa-numérico, y el tipo *spa* viene dado por el orden de repeticiones específicas. Este análisis resultaba muy

complicado hasta 2003 porque estas repeticiones están sujetas a una gran variación. Muestra de ello es que en este momento se encuentran registradas 465 repeticiones distintas, que dan lugar a 8.688 diferentes tipos de *spa* (<http://spaserver.ridom.de/>). En esa fecha fue publicado un estudio con un nuevo programa informático que permitía la determinación automática de las repeticiones y la creación de una base de datos global sincronizada con el programa. Este programa facilitó la realización de esta técnica y además, centralizó la información sobre todas las variantes que cada investigador describe en su país³⁷².

2.3.10.4 Multilocus Sequence Typing (MLST)

El MLST fue descrito por Maiden *et al.* en 1998 como respuesta a la necesidad que existía de poder comparar los aislados bacterianos que se recogían en distintas partes del mundo³⁷³. Posteriormente, Enright *et al.* desarrollaron esta técnica para *S. aureus*³⁶³. En ella se lleva a cabo la secuenciación de fragmentos internos de 7 genes no ligados, imprescindibles en el metabolismo celular básico, por lo que se trata de genes constitutivos o *housekeeping*. Estos genes codifican para las enzimas: carbamato kinasa (*arcC*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), glicerol kinasa (*glpF*), guanilato kinasa (*gmk*), fosfato acetiltransferasa (*pta*), triosa fosfatisomerasa (*tpi*), acetil coenzima A acetiltransferasa (*yqiL*). Los fragmentos de los 7 genes, todos de tamaño entre 400 y 500 pb, se amplificaron empleando los cebadores correspondientes, indicados en la Tabla 2. 14. del Anexo 2. 8. 2. En dichas amplificaciones se empleó tampón de reacción 1X, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 μM de cada uno de los cebadores, y 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido). Las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de todos los genes son las representadas en la Figura 2. 25.

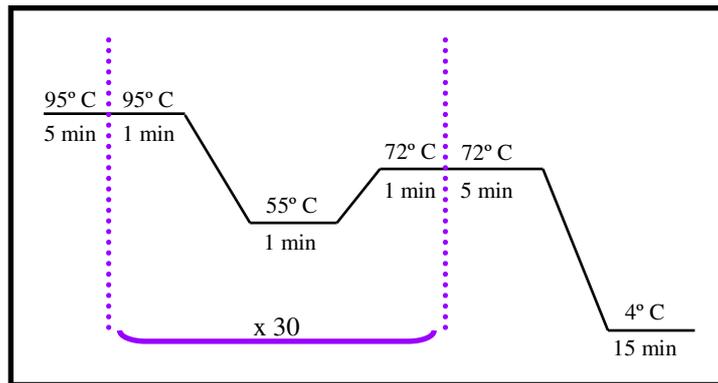


Figura 2. 25. Programa de amplificación de cada uno de los genes empleados para el análisis MLST³⁶³.

Los productos de PCR fueron visualizados y preparados para su secuenciación como ha sido descrito anteriormente.

A cada secuencia diferente (alelo) dentro de cada gen se le asigna un número, por lo que finalmente tendremos la combinación de 7 números en el orden *arcC-aroE-glpf-gmk-pta-tpi-yqiL*. A cada combinación diferente de números se le asigna otro número, que se denomina ST. Además, los STs no se encuentran aislados sino organizados en complejos clonales que recogen los ST que presentan relación clonal en base a la similitud de secuencias.

En este caso, un servidor en Internet (<http://www.mlst.net>.) permite el análisis automático de las secuencias obtenidas y la determinación del ST y CC, centralizando la información de aislados de todo el mundo.

2.4. RESULTADOS

2.4.1 Aislados clínicos, pacientes y período de estudio

Durante el periodo de estudio, se recuperaron 100 aislados SARM, catalogados como SARM-AC según los parámetros del CDC. Posteriormente, 95 aislados fueron confirmados como SARM, ya que en 5 no se detectó la presencia del gen *mecA*, resultando ser SASM. No obstante, el resto del estudio se realizó con la colección inicial completa.

El ratio de infecciones de mujeres frente a hombres fue 1.2. La edad media de los pacientes fue de 64.09 años, comprendiendo edades desde los 4 hasta los 92 años (desviación estándar [DS] \pm 19.91 años). Los pacientes se dividieron en 10 grupos, cada uno de estos abarcando personas en un rango de 10 años. Con esto, observamos dos picos de infecciones, el primero, más pequeño, en pacientes de 31 a 40 años, y el segundo en pacientes de 71 a 80 años (Figura 2. 26).

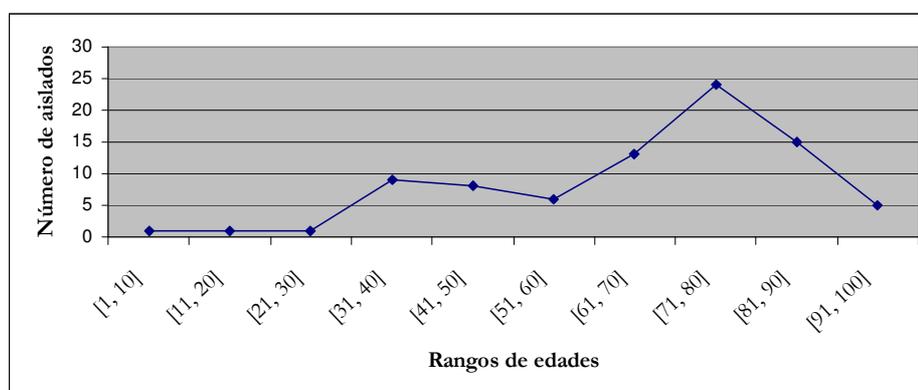


Figura 2. 26. Gráfico que representa la distribución de los aislados SARM recuperados de cada grupo de edad establecido en este estudio.

Los 95 aislados SARM estuvieron distribuidos entre los 8 municipios que participaron en el estudio, habiéndose recuperado el mayor número de aislados de Santa Cruz de Tenerife y del Puerto de la Cruz (Figura 2. 12). En general, teniendo en cuenta el número de personas referidas a cada Centro de Salud del estudio (ver página web:

http://www2.gobiernodecanarias.org/istac/estadisticas/php/saltarA.php?mid=/istac/estadisticas/sanidad/area_04_frame.html), la prevalencia de las infecciones registradas causadas por SARM-AC fue $< 0.1\%$ en cada municipio durante el periodo de estudio. No es posible realizar una comparación en función del año en el que fue recogido cada aislado, ya que los años 2004 y 2007 no se analizaron completos. No obstante, los aislados recuperados en 2005 fueron 38, frente a los 49 del 2006, si bien esta diferencia puede deberse tanto a un aumento en la prevalencia de infecciones por SARM en la comunidad, como a la realización de controles más exhaustivos

2.4.2 Infecciones

Los SARM se asociaron en mayor medida con SSTIs (82.1%; $n = 79$), entre las que se encontraron úlceras ($n = 49$), infecciones de heridas ($n = 29$) y abscesos ($n = 1$). Los aislados restantes se recuperaron de muestras de exudados óticos (6.3%; $n = 6$), exudados nasales (4.2%; $n = 4$), exudados faríngeos (3.2%; $n = 3$), esputos (1.1%; $n = 1$), seroma (1.1%; $n = 1$) y orina (1.1%; $n = 1$) (Figura 2. 27).

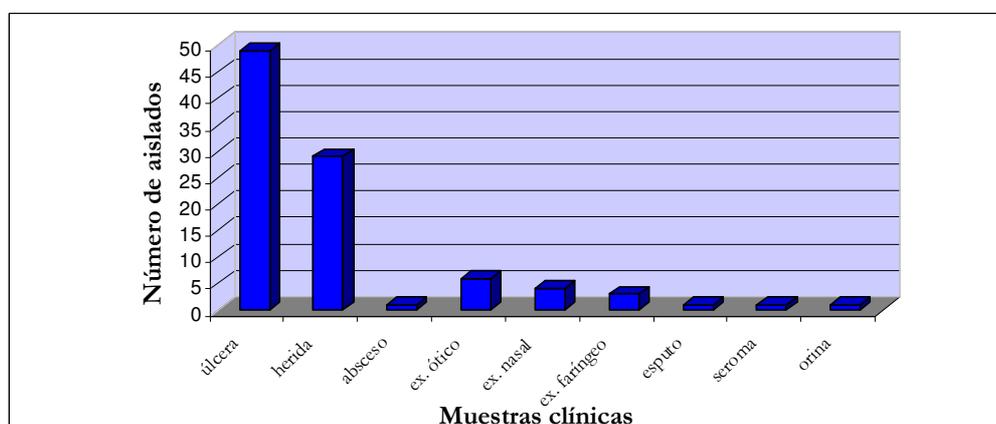


Figura 2. 27. Histograma que refleja el número de aislados que se recuperaron de las distintas muestras clínicas, donde se puede observar cómo las muestras pertenecientes a SSTIs superan el 75% del tamaño muestral.

Los aislados SARM pertenecieron a muestras clínicas de herida ($n = 1$), úlcera ($n = 1$), exudado ótico ($n = 1$), exudado nasal ($n = 1$) y orina ($n = 1$).

2.4.3 Patrones de susceptibilidad antimicrobiana

Los aislados presentaron fenotipos de susceptibilidad antimicrobiana heterogéneos, detectándose un total de 13 perfiles, I-XIII (Tabla 2. 4). Todos los aislados SARM fueron resistentes a los antibióticos β -lactámicos y susceptibles a los antibióticos trimetropim-sulfametoxazol, teicoplanina y vancomicina. Solamente en un aislado se detectó resistencia inducible a la clindamicina. Curiosamente, un 60.00% ($n = 57$) de los aislados SARM fueron multirresistentes (considerándose multirresistentes cuando presentan resistencia a tres o más clases de antibióticos no β -lactámicos), mientras que solo un 3.16% ($n = 3$) fueron susceptibles a todos los antibióticos no β -lactámicos testados.

Tabla 2. 4. Trece perfiles de susceptibilidad antimicrobiana detectados entre los 95 aislados SARM. La tabla muestra el número de aislados pertenecientes perfil de susceptibilidad, así como el porcentaje de aislados resistentes a cada antibiótico de manera independiente.

Perfil	Clindamicina	Ciprofloxacino	Gentamicina	Eritromicina	Mupirocina	Nº de aislados
I	S	S	S	S	S	3
II	S	R	S	S	S	23
III	S	S	R	S	S	1 ^a
IV	R	S	S	R	S	1 ^b
V	S	R	S	R	S	6
VI	S	R	S	S	R	4
VII	R	R	S	R	S	33
VIII	S	R	R	S	R	6
IX	S	R	S	R	R	1
X	R	R	S	R	R	4
XI	R	R	R	R	S	1
XII	S	R	R	R	R	1
XIII	R	R	R	R	R	11
Aislados (%)	52.6	94.7	21.1	61.1	28.4	95

S: Aislados sensibles al antibiótico indicado en el encabezado de la columna; R: Resistencia al antibiótico indicado; superíndice a: Aislados que mostró resistencia intermedia a la gentamicina; superíndice b: Aislado con resistencia inducible a la clindamicina.

Los aislados SASM fueron susceptibles a todos los antibióticos, excepto uno de ellos, que a pesar de ser susceptible a los β -lactámicos, mostró resistencia a clindamicina, eritromicina y gentamicina.

2.4.4 Resistencia altas concentraciones de mupirocina

En los 27 aislados en los que el método de difusión por disco mostró resistencia a altas concentraciones de mupirocina, se confirmó la presencia del gen *ileS2* mediante PCR. Todos los aislados resistentes a altas concentraciones de mupirocina presentaron una CMI superior a 1024 $\mu\text{g/ml}$, según las tiras de E-test empleadas (AB Biodisks[®], Suecia). No obstante, dentro de este grupo de resistencia se detectaron dos fenotipos distintos, en algunas placas se observó un crecimiento con densidad completa, mientras que otras mostraron un crecimiento con densidad incompleta alrededor de la tira de E-test, tal y como muestra la Figura 2. 28.

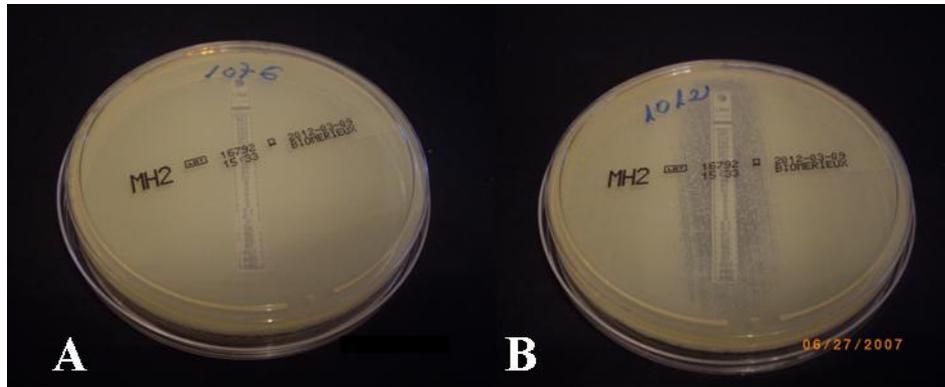


Figura 2. 28. Fenotipos distintos observados en la determinación de resistencia a altas concentraciones de mupirocina mediante E-test. A muestra el aislado 1076, que presentó crecimiento homogéneo en césped cubriendo toda la superficie de la placa. B muestra el aislado 1012, en el que el crecimiento alrededor de la tira de antibiótico no cubrió toda la superficie de la placa.

Los 27 aislados resistentes a altas concentraciones de mupirocina correspondieron a tres CCs distintos: CC30, CC5 y CC22, siendo la mayoría de ellos, 23 de 27, multirresistentes.

Así mismo, el análisis mediante *Southern blot* permitió confirmar la localización de este gen en plásmidos, los cuales por comparación con el marcador de peso molecular, presentan un tamaño de aproximadamente 23 kb, probablemente correspondiendo con su forma linealizada (Figura 2. 29).

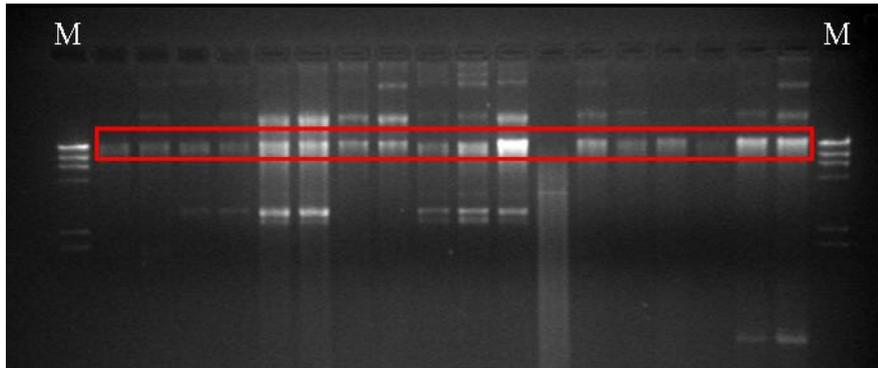


Figura 2. 29. Imagen de los perfiles plasmídicos obtenidos, mostrando en este caso 18 de los 27 aislados *ileS2*⁺, correspondientes con los carriles no marcados. Los carriles indicados con la letra M, corresponden con el marcador de peso molecular II (Roche Diagnostics, Suiza). El recuadro rojo enmarca las bandas en las que se detectó hibridación con la sonda *ileS2*, revelando, por tanto, los plásmidos portadores de este gen.

2.4.5 Expresión del gen *ileS2*

La expresión del gen *ileS2* fue estudiada en 11 de los 27 aislados resistentes a altas concentraciones de mupirocina, crecidos en medio BHI en ausencia del antibiótico. El rendimiento obtenido a partir de la extracción y posterior purificación de ARN resultó óptimo, consiguiendo concentraciones elevadas y con un adecuado cociente 260/280, como muestran las medidas realizadas en el NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos), reflejadas en la Tabla 2. 5.

Tabla 2. 5. Datos referidos a las concentraciones de ARN obtenidas para cada aislado y su correspondiente cociente 260/280, tras la primera extracción con el kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Alemania) y tras su purificación manual con DNasa.

Aislado	[ARN] extraído (260/280)	[ARN] purificado (260/280)
953	565.7 ng/μl (2,15)	603.4 ng/μl (1.98)
968	752.3 ng/μl (2,20)	809.0 ng/μl (2.06)
974	313.2 ng/μl (2.14)	245.0 ng/μl (1.97)
989	185.5 ng/μl (2.11)	182.4 ng/μl (1.82)
1000	562.1 ng/μl (2.20)	385.7 ng/μl (1.96)
1002	242.9 ng/μl (2.20)	177.6 ng/μl (1.89)
1003	109.9 ng/μl (2.06)	94.1 ng/μl (1.80)
1012	663.4 ng/μl (2.16)	593.0 ng/μl (2.00)
1013	388.0 ng/μl (2.18)	337.8 ng/μl (1.96)
1032	197.3 ng/μl (2.15)	164.2 ng/μl (1.89)
1076	460.3 ng/μl (2.19)	286.0 ng/μl (1.96)

Tras el análisis de los ARN purificados, en el Experion (Bio-rad, Estados Unidos) se comprobó la limpieza de las muestras, especialmente la ausencia de contaminación con ADN, tal y como muestra la

Figura 2. 30. Debido a que la extracción se realizó del ARN total de la bacteria, se pueden observar en dicha figura bandas de distintos tamaños, además de las correspondientes al ARN ribosómico (ARNr) 23S y 16S.

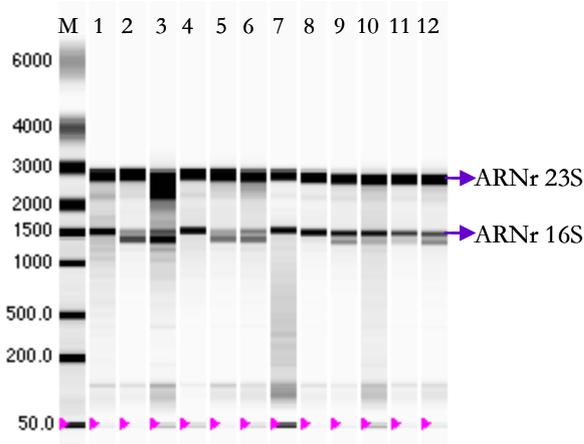


Figura 2. 30. Imagen ofrecida por el sistema automático de electroforesis Experion (Bio-rad, Estados Unidos) donde se pueden observar las extracciones de ARN total, sin contaminación por ADN.

Se consiguió optimizar la PCR en tiempo real de forma que los coeficientes de correlación de los dos genes incluidos en el estudio, *ileS2* y *gmk*, se encuentran próximos a 1, así como presentan eficiencias similares, que se encuentran dentro del rango aceptado (Figura 2. 31). A partir de las diluciones seriadas se eligió la dilución 1/10 para la realización de los experimentos.

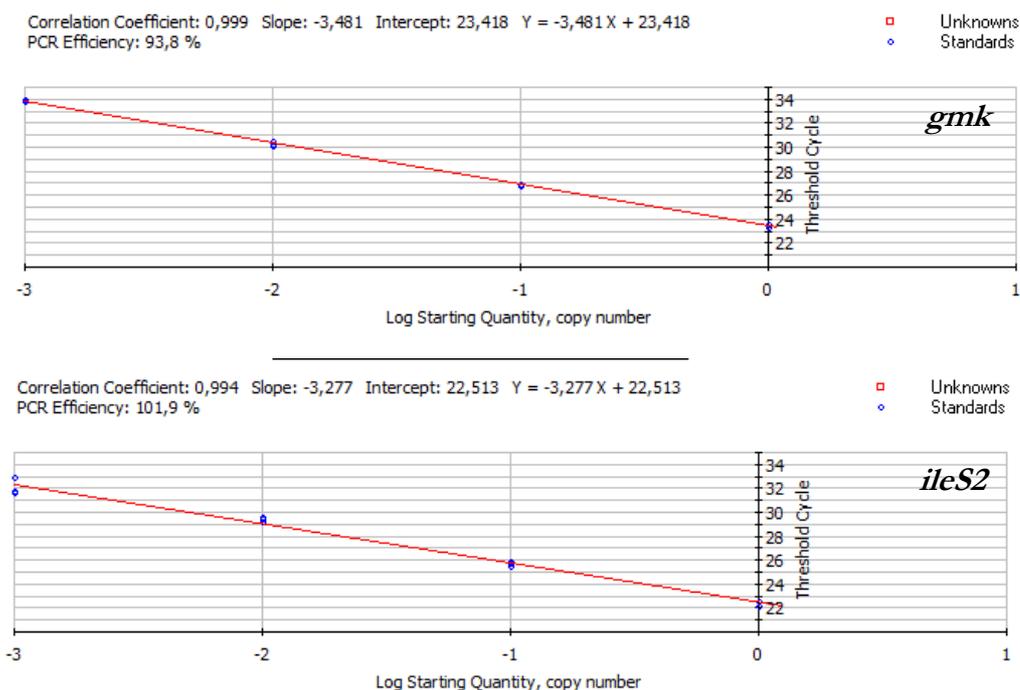


Figura 2. 31. Gráficos correspondientes a las rectas obtenidas a partir de diluciones seriadas del ADNc de los dos genes incluidos en el estudio. En ellas se puede apreciar los coeficientes de correlación, las pendientes y las eficiencias de cada uno.

Los experimentos de PCR en tiempo real confirmaron la expresión constitutiva del gen *ileS2*, pero también mostraron distintos niveles de expresión para el mismo. Dentro de los 11 aislados escogidos para este análisis, 4 mostraron el fenotipo de densidad incompleta (989, 1002, 1003, 1012), y 7 el de densidad completa (953, 968, 974, 1000, 1013, 1032, 1076), explicados previamente (Figura 2. 28). Se intentó establecer relación entre la expresión del gen *ileS2* y el fenotipo de resistencia a alta concentración de mupirocina, en cada aislado. Con este fin, se eligió como muestra de referencia para el análisis de cuantificación relativa uno de

los aislados pertenecientes al fenotipo denominado densidad incompleta, concretamente el aislado 1003. Resultado de este análisis, se puede observar que los 4 aislados pertenecientes al fenotipo de densidad incompleta mostraron niveles de expresión similares, mientras que los pertenecientes al fenotipo de densidad completa mostraron niveles superiores de expresión del gen *ileS2*, con la excepción del aislado 968 (Figura 2. 32).

Tabla 2. 6. Resultados obtenidos aplicando el método de cuantificación relativa a partir de los Cts obtenidos para cada aislado, tomando como referencia el aislado 1003.

Aislado	Media Ct _{ileS2} (DS)	Media Ct _{gmk} (DS)	ΔCt (DS)	ΔΔCt (DS)	Número de veces (DS)
953	31.57 (± 0.47)	33.80 (± 0.14)	-2.23 (± 0.28)	-1.13 (± 0.41)	2.19 (± 0.63)
968	34.93 (± 0.15)	31.57 (± 0.31)	3.37 (± 0.20)	4.47 (± 0.36)	0.05 (± 0.01)
974	27.30 (± 0.17)	31.60 (± 0.35)	-4.30 (± 0.22)	-3.20 (± 0.37)	9.19 (± 2.38)
989	31.57 (± 0.42)	31.63 (± 0.31)	-0.07 (± 0.30)	1.03 (± 0.42)	0.49 (± 0.14)
1000	24.10 (± 0.10)	30.53 (± 0.35)	-6.43 (± 0.21)	-5.33 (± 0.37)	40.32 (± 10.25)
1002	27.63 (± 0.15)	27.63 (± 0.06)	0.00 (± 0.09)	1.10 (± 0.31)	0.46 (± 0.10)
1003*	26.30 (± 0.30)	27.40 (± 0.42)	-1.10 (± 0.30)	0.00 (± 0.42)	1.00 (± 0.29)
1012	27.63 (± 0.47)	27.63 (± 0.21)	0.00 (± 0.30)	1.10 (± 0.42)	0.46 (± 0.14)
1013	25.53 (± 0.15)	27.67 (± 0.29)	-2.13 (± 0.19)	-1.03 (± 0.35)	2.05 (± 0.50)
1032	25.67 (± 0.06)	27.67 (± 0.47)	-2.00 (± 0.27)	-0.90 (± 0.41)	1.87 (± 0.53)
1076	27.60 (± 0.20)	31.63 (± 0.49)	-3.65 (± 0.31)	-2.55 (± 0.43)	8.87 (± 1.75)

1003*: Aislado empleado como muestra de referencia. Recuadros verdes: Indican los aislados pertenecientes al fenotipo de resistencia a altas concentraciones de mupirocina de densidad incompleta.

La expresión media del gen *ileS2* en los aislados con fenotipo de densidad incompleta fue de 0.61, mientras que en los demás, presentó un nivel de expresión media de 9.05. Aplicando el test estadístico Mann-Whitney se observó que esta diferencia no era significativa, con un p valor de 0.058. El análisis se repitió excluyendo el aislado 968, que es el dato más dispar dentro del grupo de fenotipo de densidad completa. Esto hizo aumentar el valor medio de expresión del gen *ileS2* en el segundo grupo a 10.54, obteniendo un p valor de 0.010; por lo que en este caso, la diferencia sí es significativa (Figura 2. 32).

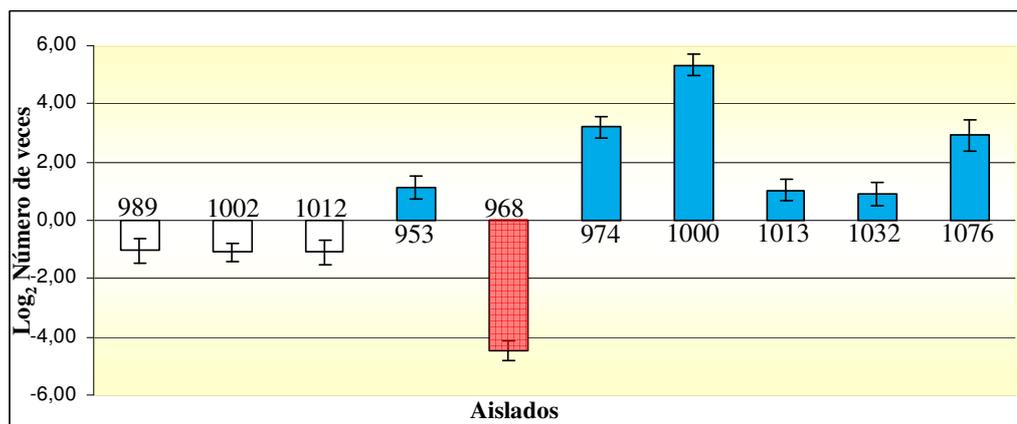


Figura 2. 32. Representación del número de veces que se expresa el gen *ileS2* en los aislados SARM incluidos en el estudio, en relación a la muestra de referencia. Las tres primeras barras pertenecen al grupo con fenotipo de resistencia a altas concentraciones de mupirocina de densidad incompleta, mientras que los restantes, pertenecen al fenotipo de densidad incompleta. Se observa cómo todos los aislados del primer grupo presentaron una menor expresión del gen *ileS2*, mientras que los del segundo grupo expresan dicho gen en mayor medida. Se encontró una excepción en el aislado 968, coloreado en rojo, cuya expresión del gen presentó los niveles más bajos.

2.4.6 Toxinas

La toxina PVL fue detectada únicamente en 5 de los 95 SARM del estudio (5.26%), y se encontró distribuida entre 3 CC distintos: CC8 ($n = 3$), CC30 ($n = 1$) y CC22 ($n = 1$), todos ellos portando el SCC*mecIV*. Todos estos aislados PVL⁺ fueron recuperados de muestras clínicas de SSTIs: heridas ($n = 1$) y úlceras ($n = 1$), y de orina ($n = 1$) de pacientes pertenecientes a los grupos de edad [11-20] ($n = 1$), [31, 40] ($n = 3$) y [41-60] ($n = 1$). Además, curiosamente estas muestras se recogieron en los Centro de Salud de Arona ($n = 4$) y Granadilla de Abona ($n = 1$), ambos localizados en el sur de la isla (Figura 2. 12). De estos 5 aislados, dos fueron sensibles a todos los antibióticos no β -lactámicos, dos fueron resistentes a eritromicina y ciprofloxacino, y uno, el detectado en Granadilla de Abona, mostró resistencia intermedia a la gentamicina.

En contra de los datos esperados, la Hlg- γ se encontró solamente en un 45% de los aislados. Sólo dos de los 5 aislados portadores del PVL, presentaron también la Hlg- γ . Estos dos aislados, productores de ambas toxinas, fueron los correspondientes al CC30 y al CC22; ninguno de los 3 SARM pertenecientes al CC8, portaban los genes codificantes para la Hlg- γ .

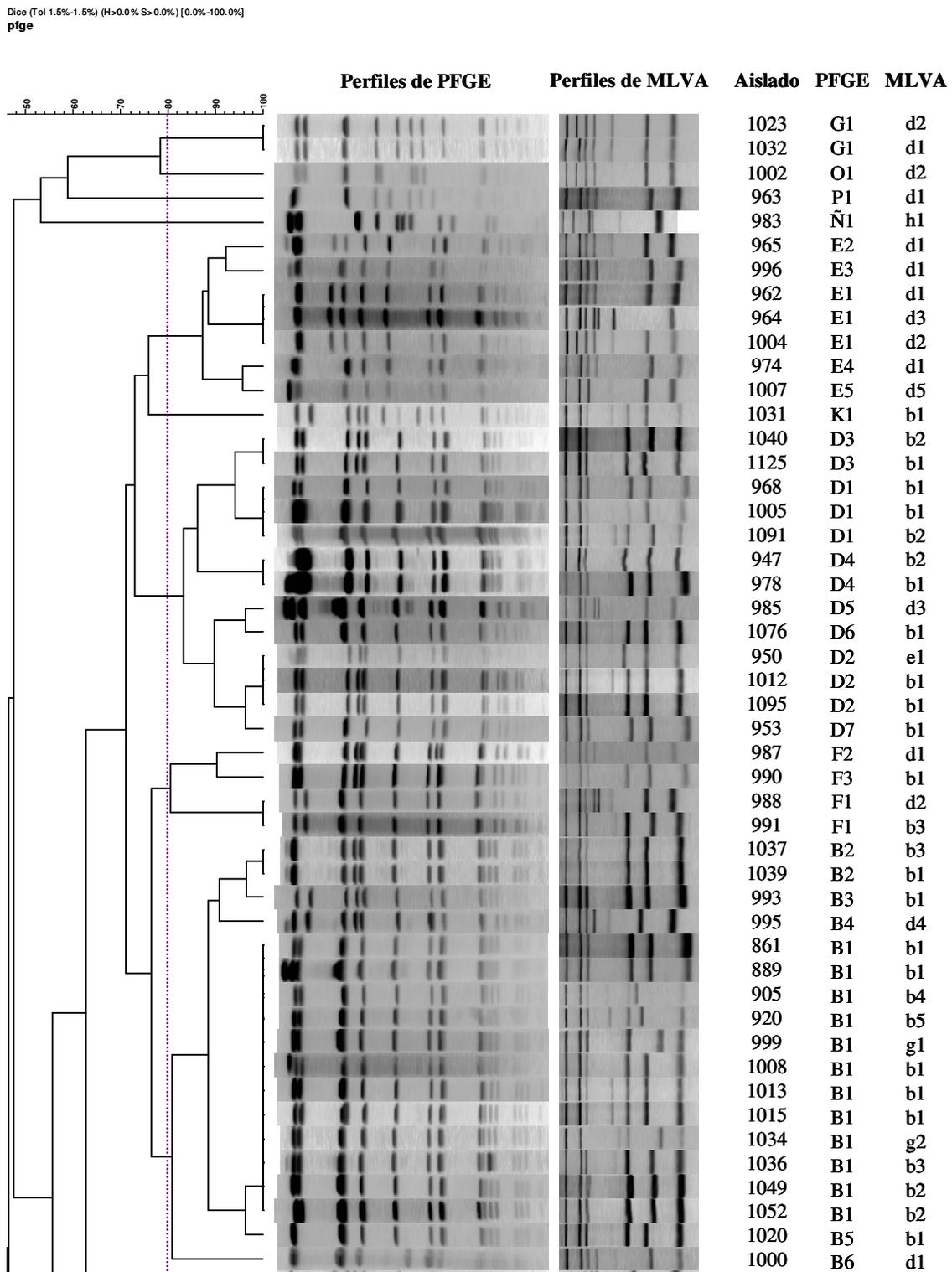
2.4.7 Tipificación

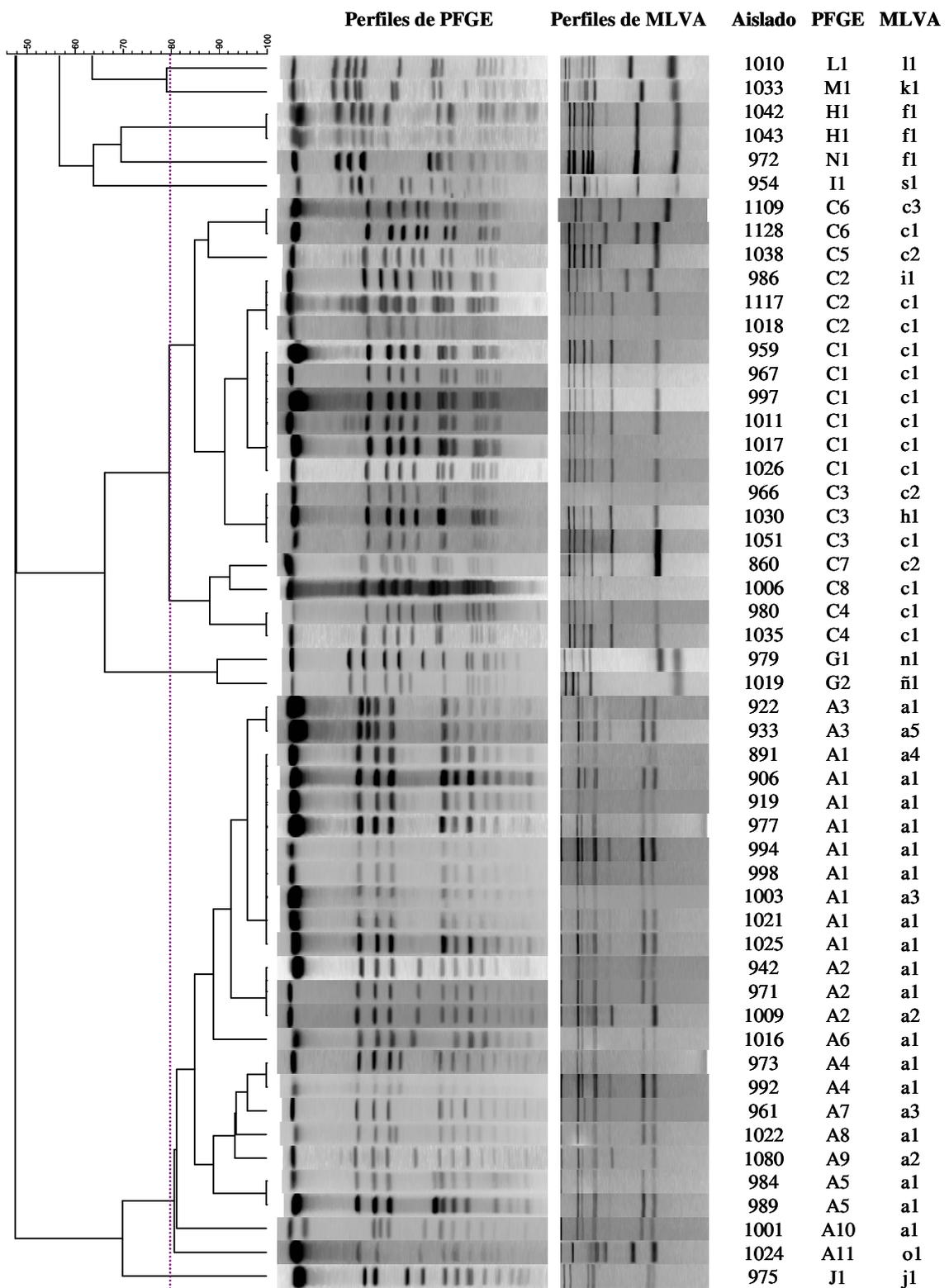
Todos los aislados SARM mostraron un patrón *SCCmec* identificable por los dos métodos empleados en este estudio. El *SCCmec* tipo II se encontró en un 24.21% de los aislados ($n = 23$), todos ellos multirresistentes y pertenecientes al ST36 (CC30). El *SCCmec* tipo IV se detectó en un 26.30% de los aislados ($n = 25$) distribuidos entre los ST22 (CC22), ST8 (CC8), ST97 (CC97) y ST30 (CC30). Finalmente, la variante IVA se identificó en un 49.47% de los aislados SARM ($n = 47$), distribuido entre los aislados ST125 y ST146 (CC5) y ST1434 (CC72). El *SCCmec* tipo V no fue detectado entre nuestros aislados.

El PFGE dio lugar a 41 patrones de bandas distintos, lo cuales fueron englobados en 16 tipos (A-P). El tipo A quedó constituido como el grupo más numeroso ($n = 25$), presentando 11 subtipos, seguido por los grupos B ($n = 18$) y C ($n = 18$), con 6 subtipos cada uno; D ($n = 13$) y E ($n = 7$), con 5 y 4 subtipos, respectivamente; y F ($n = 4$), G ($n = 4$) y H ($n = 2$), con 3, 2 y 2 subtipos, respectivamente. Los 9 tipos de la I a la P resultaron ser clones esporádicos, con un único representante (Figura 2. 33).

El MLVA dio lugar a 30 patrones de bandas diferentes, que se agruparon en 16 tipos (a-l, n, ñ, o, s). El tipo más numeroso fue el b ($n = 28$), que quedó dividido en 5 subtipos, seguido por los grupos a ($n = 23$), c ($n = 17$) y d ($n = 16$), con 5, 3 y 5 subtipos, respectivamente. Los tipos h-l, n, ñ, o y s, mostraron un único aislado cada uno (Figura 2. 33).

Figura 2. 33. Dendrograma obtenido mediante el coeficiente de Dice, aplicando un 1% de tolerancia, según los patrones de PFGE. Simultáneamente se muestra el perfil de MLVA obtenido para cada aislado.





La tipificación *spa* reveló la presencia de 21 tipos distintos (Figura 2. 34). El tipo más abundante, el t021, se detectó en los aislados ST36 y el único aislado ST30; si bien dos aislados ST36 mostraron tipos *spa* únicos, t2005 y t5148. Los tipos t010 y t067 se detectaron indistintamente en aislados pertenecientes a los ST125 y ST146, ambos pertenecientes al mismo CC (CC5), aunque 5 de ellos mostraron tipos *spa* únicos: t1560, t3753, t6143, t7676, y el descrito por primera vez en nuestro estudio, t7575. Los ST22 y ST217, ambos pertenecientes al CC22, mostraron el tipo de *spa* t032; 3 aislados ST22 mostraron un tipo de *spa* distinto: t005, t3677 y t7678. Los aislados restantes mostraron tipos *spa* esporádicos.

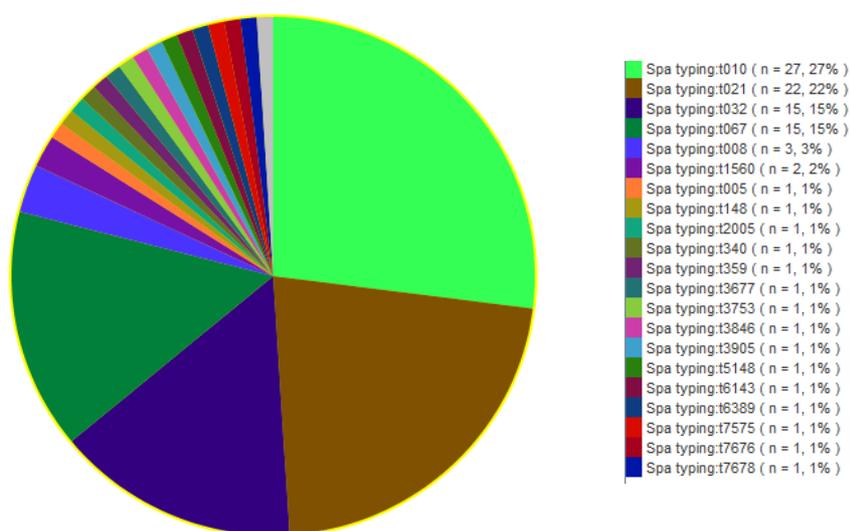


Figura 2. 34. Representación de los 21 tipos distintos de *spa* detectados en este estudio, obtenida mediante el programa PhyloViz (<http://www.phyloViz.net/wiki/>).

El MLST agrupó los aislados del estudio en 8 complejos clonales, los cuales incluyeron 12 STs, 16 tipos de PFGE, 16 tipos de MLVA (Figura 2. 33) y 21 tipos *spa* (Figura 2. 34). Todos estos datos se encuentran recogidos en la Tabla 2. 7. Como se puede observar, el CC5 fue el grupo más numeroso y diverso, seguido por los complejos clonales 30 y 22. Los aislados restantes, supusieron el 5.30 % del total de SARM del estudio. La cepa SARM ST1434 (t148), ha sido descrita en este estudio por primera vez. Esta nueva cepa fue recuperada de una muestra de exudado faríngeo y mostró resistencia a β -lactámicos, clindamicina, eritromicina y resistencia inducible a ciprofloxacina. Es un *slv*, *tnv* de la cepa ST72, en el gen *yqiL*, perteneciente al CC72. La cepa SASM ST1433 (t6389) también fue

descrita en este estudio por primera vez. Ésta fue aislada de una muestra de orina, que resultó susceptible a todos los antibióticos testados. Al compararla en la base de datos del MLST se observó que se trata de una cepa aislada, no perteneciente a ningún complejo clonal descrito hasta el momento.

Tabla 2. 7. Resumen de las características clínicas y moleculares de los aislados SARM y SASM recuperados de la comunidad en la isla de Tenerife.

Aislado	Edad del paciente	Muestra clínica	Municipio	Perfil de susceptibilidad antimicrobiana	PVL	PFGE	MLVA	spa	ST	CC	SCCmec
860	82	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	C7	c1	t032			IV
861	85	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E, MUP	-	B1	b1	t010			IVA
889	63	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CIP	-	B1	b1	t010			IVA
891	79	Seroma	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	A1	a4	t021	36	30	II
905	75	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	B1	b4	t3753			IVA
906	83	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	A1	a1	t021	36	30	II
919	56	Exudado de herida	Arona	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	A1	a1	t021	36	30	II
920	34	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	B1	b5	t7676			IVA
922	66	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	A3	a1	t021			II
933	66	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	A3	a5	t021			II
942	81	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CC, CIP, E	-	A2	a1	t021			II
947	78	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CIP	-	D4	b2	t010			IVA
950	53	Exudado ótico	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	D2	e1	t010			IVA
953	92	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	D7	b1	t010			IVA
954	39	Exudado de úlcera	Santa Cruz	SENSIBLE	-	I1	s1	t6143	26	25	SASM
959	69	Absceso	Santa Cruz	R: CIP	-	C1	c1	t032	22	22	IV
961	-	Exudado nasal	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	A7	a3	t021			II
962	73	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CIP, E	-	E1	d1	t067	125	5	IVA
963	82	Orina	La Laguna	R: CIP, GENTA, MUP	-	P1	d1	t067	125	5	IVA
964	91	Exudado de herida	Tacoronte	R: CIP	-	E1	d3	t7575			IVA

965	73	Exudado de herida	La Laguna	R: CIP, E	-	E2	d1	t067		8	8	IV
966	80	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CIP	-	C3	c1	t032				IV
967	71	Exudado de herida	Guímar	R: CC, CIP, E	-	C1	c1	t032				IV
968	56	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CIP, MUP	-	D1	b1	t010				IVA
971	48	Exudado de úlcera	Tacoronte	R: CC, CIP, E	-	A2	a1	t021				II
972	56	Exudado de úlcera	Arona	SENSIBLE	+	N1	fl	t008		8	8	IV
973	48	Exudado de herida	Tacoronte	R: CC, CIP, E	-	A4	a1	t021				II
974	80	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP, MUP	-	E4	d1	t067				IVA
975	17	Exudado de úlcera	Arona	SENSIBLE	+	J1	j1	t021	30	30	30	IV
977	83	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CC, CIP, E	-	A1	a1	t2005				II
978	84	Exudado de úlcera	Candelaria	R: CC, CIP, E	-	D4	b1	t010				IVA
979	10	Exudado ótico	La Laguna	SENSIBLE	-	G1	n1	t340	45	45	45	SASM
980	4	Espujo	Santa Cruz	R: CIP	-	C4	c1	t032	217	217	22	IV
983	46	Orina	Santa Cruz	SENSIBLE	-	Ñ1	h1	t6389	1433	-	-	SASM
984	77	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E	-	A5	a1	t021				II
985	76	Exudado de úlcera	Tacoronte	R: CIP	-	D5	d3	t067	125	5	5	IVA
986	35	Exudado ótico	Granadilla de Abona	R.I.: GENTA	+	C2	i1	t005	22	22	22	IV
987	34	Exudado de herida	Tacoronte	R: CIP	-	F2	d1	t067				IVA
988	70	Exudado de herida	Tacoronte	R: CIP	-	F1	d2	t067				IVA
989	76	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	A5	a1	t021				II
990	54	Exudado ótico	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	F3	b1	t010	146	5	5	IVA
991	86	Exudado de úlcera	Candelaria	R: CC, CIP, E	-	F1	b3	t1560				IVA
992	48	Exudado de úlcera	Tacoronte	R: CC, CIP, E	-	A4	a1	t021				II

993	-	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	B3	b1	t010	IVA
994	83	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CC, CIP, E	-	A1	a1	t021	II
995	41	Exudado de úlcera	Guímar	R: CIP	-	B4	d4	t067	IV
996	-	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	E3	d1	t067	IVA
997	77	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	C1	c1	t032	IV
998	-	Exudado nasal	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E	-	A1	a1	t021	II
999	82	Exudado nasal	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	B1	g1	t1560	IVA
1000	-	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP, GENTA, MUP	-	B6	d1	t067	IVA
1001	92	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CC, CIP, E	-	A11	a1	t021	II
1002	74	Exudado nasal	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	O1	d2	t067	IVA
1003	-	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E, MUP	-	A1	a3	t021	II
1004	-	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP, E	-	E1	d2	t067	IVA
1005	68	Exudado de úlcera	Guímar	R: CIP	-	D1	b1	t010	IVA
1006	63	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	C8	c2	t7678	IV
1007	-	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP, E	-	E5	d5	t067	IVA
1008	46	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	B1	b1	t010	IVA
1009	49	Exudado de úlcera	Arona	R: CC, CIP, E	-	A2	a2	t5148	II
1010	15	Exudado faríngeo	Arona	R: CC, CIP (inducible), E	-	L1	l1	t148	IVA
1011	83	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E	-	C1	c1	t032	IV
1012	90	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	D2	b1	t010	IVA
1013	79	Exudado de úlcera	Granadilla de Abona	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	B1	b1	t010	IVA
1015	65	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E	-	B1	b1	t010	IVA
1016	89	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CC, CIP, E	-	A6	a1	t021	II

1017	74	Exudado de herida	Guímar	R: CC, CIP, E	-	C1	c1	t032	IV
1018	74	Exudado de herida	Guímar	R: CC, CIP, E	-	C2	c1	t032	IV
1019	31	Exudado nasal	Santa Cruz	SENSIBLE	-	G2	ñ1	t3846	SASM
1020	79	Exudado de herida	Puerto de la Cruz	R: CIP	-	B5	b1	t010	IVA
1021	38	Exudado de herida	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E	-	A1	a1	t021	II
1022	49	Exudado de herida	Tacoronte	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	A8	a1	t021	II
1023	-	Exudado de herida	Arona	R: CIP, GENTA, MUP	-	G1	d2	t067	IVA
1024	68	Exudado de herida	Guímar	R: CC, E, GENTA	-	A9	o1	t3905	SASM
1025	69	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA	-	A1	a1	t021	II
1026	69	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	C1	c1	t032	IV
1030	43	Exudado ótico	La Laguna	R: CIP, E, GENTA, MUP	-	C3	c1	t032	IV
1031	87	Exudado de úlcera	Candelaria	R: CC, CIP, E	-	K1	b1	t010	IVA
1032	77	Exudado de úlcera	Candelaria	R: CIP, E, MUP	-	G1	d1	t067	5 IVA
1033	79	Exudado de úlcera	Santa Cruz	SENSIBLE	-	M1	k1	t359	97 IV
1034	78	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	B1	g2	t010	IVA
1035	74	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	C4	c1	t032	217 IV
1036	91	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CIP	-	B1	b3	t010	IVA
1037	-	Exudado de herida	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E, GENTA, MUP	-	B2	b3	t010	IVA
1038	-	Exudado de herida	Arona	R: CIP	-	C5	c2	t3677	22 IV
1039	68	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CIP, GENTA, MUP	-	B2	b1	t010	IVA
1040	91	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CIP, GENTA, MUP	-	D3	b2	t010	IVA
1042	36	Exudado de herida	Arona	R: CIP, E	+	H1	fl	t008	8 IV
1043	33	Exudado de herida	Arona	R: CIP, E	+	H1	fl	t008	8 IV

1049	35	Exudado ótico	Arona	R: CC, CIP, E, MUP	-	B1	b2	t010	IVA
1051	24	Exudado faríngeo	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	C3	c1	t032	IV
1052	35	Exudado ótico	Arona	R: CC, CIP, E, MUP	-	B1	b2	t010	IVA
1076	89	Exudado de herida	Santa Cruz	R: CIP, MUP	-	D6	b1	t010	IVA
1080	36	Exudado faríngeo	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	A9	a2	t021	36 30
1091	78	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CIP	-	D1	b2	t010	IVA
1095	54	Exudado de úlcera	Puerto de la Cruz	R: CC, CIP, E	-	D2	b1	t010	IVA
1109	68	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CIP, MUP	-	C6	c3	t032	IV
1117	80	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CC, CIP, E	-	C2	c1	t032	IV
1125	66	Exudado de úlcera	La Laguna	R: CIP, GENTA, MUP	-	D3	b1	t010	IVA
1128	76	Exudado de úlcera	Santa Cruz	R: CIP	-	C6	h1	t2781	IV

2.5. DISCUSIÓN

La emergencia de las infecciones causadas por clones de SARM-AC supone actualmente un problema a nivel global. Sin embargo, debido a que se han establecido definiciones distintas para estos aislados, resulta difícil extraer conclusiones comunes para todos, permaneciendo abierto un debate sobre si deberían considerarse como un grupo epidemiológicamente independiente de SARM-AH.

En este estudio, se han investigado las características de las cepas de SARM-AC que se encuentran circulando en varios municipios de Tenerife, tomando como punto de partida aquellas que cumplieran los mínimos requerimientos para definir las, que son las condiciones del CDC¹⁸⁶. En España se han realizado algunos estudios epidemiológicos sobre SARM-AC, pero nuevamente cada grupo ha elegido los criterios a aplicar para definir estas cepas, no coincidiendo en algunos casos. Eso, sumado a que algunos de ellos no analizan el linaje genético al que pertenecen los aislados, hace difícil poder comparar los resultados obtenidos en cada caso³⁷⁶⁻³⁸⁴. Sin embargo, en aquellos estudios donde sí se determinó ese linaje genético, coinciden algunos de los clones detectados, siendo especialmente relevante la presencia de la cepa ST8-SCC*mecIV* PVL⁺. En Tenerife, debido a las características especiales derivadas de la insularidad, por un lado el aislamiento geográfico, y por otro, el turismo, no resultaría adecuado extrapolar estos datos obtenidos en otros lugares de España, sino que es necesario llevar a cabo un estudio específico en la isla. Además, la detección de la cepa SARM ST152 PVL⁺ en un caso comunitario de furunculosis familiar hace sospechar de la emergencia de cepas SARM PVL⁺ en nuestra comunidad²²⁸, lo cual es importante estudiar.

La prevalencia de aislados SARM-AC detectada durante el periodo de estudio resultó baja (< 0.1%), pero la frecuencia real en Tenerife no puede ser extraída de aquí, ya que las muestras clínicas analizadas procedieron sólo de 8 de los 31 municipios de Tenerife. Por lo tanto, se necesitan estudios posteriores que incluyan muestras de la totalidad de la isla, los cuales permitan hablar de un modo fehaciente sobre la prevalencia. No obstante, como se expuso en la introducción, si se consideran otros países como referencia, se puede predecir un aumento de infecciones comunitarias, si no se toman las medidas de control y prevención

oportunas. Por ejemplo, en Los Ángeles se observó una prevalencia alta, de un 29% en los años 2001-2002, de SSTIs adquiridas en la comunidad causadas por SARM, pero este porcentaje aumentó aún más, a un 64%, en el periodo 2003-2004²⁸⁵. Así como en Australia, donde se realizan estudios bianuales, que entre los años 2000 y 2004 mostraron un incremento en el número de aislados SARM-AC, de un 4.7% a un 7.3%²⁸⁴. Para evitar que esto suceda en la isla, es necesario el ejercicio de una labor de vigilancia por parte de los médicos de familia, en la que se debe incluir la detección y comunicación de casos centinela, como Cookson propuso³⁸⁵. En Tenerife, podríamos considerar como ejemplo de caso centinela, la previamente mencionada, expansión familiar de la cepa SASM ST152 PVL⁺²²⁸. No obstante, los datos actuales parecen indicar que las cepas SARM-AH continúan siendo aquí un problema mayor, que las SARM-AC.

De los 100 aislados que fueron enviados a la Unidad de Investigación como SARM, resultó llamativa la ausencia del gen *mecA* en 5 de ellos, identificándose como SASM. No pudimos constatar el motivo del error, pero, sin duda, las técnicas moleculares, como en este caso es la amplificación mediante PCR del gen, constituyen una herramienta de diagnóstico más fiable que las basadas en el fenotipo.

Naimi *et al.* en un estudio en el que compararon las características de los aislados SARM-AH frente a los SARM-AC, observaron que la edad de los pacientes afectados por cada grupo variaba significativamente. De ese modo, la edad media de los pacientes afectados por infecciones comunitarias era de 30 años, frente a la media de 70 años obtenida en pacientes con infecciones hospitalarias²³⁸. Nuestro estudio no reprodujo estos resultados, ya que la media de edad detectada aquí (64.09 años) se aleja considerablemente de 30 años. Si bien se observa un pico en el rango de edad de los 31-40 años, éste es superado en los rangos de edades superiores comprendidos entre los 61 y los 90 años (Figura 2. 26). Esta observación podría suponer un indicio de que en nuestra comunidad existe mezcla de aislados de ambos ambientes, y que las infecciones producidas por SARM-AH podrían enmascarar, en cuanto a la media de edad de los pacientes, las causadas por SARM-AC. Si este estudio hubiera considerado la presencia del PVL como marcador de cepas comunitarias, la colección de SARM-AC se hubiera reducido a 5 aislados, disminuyendo la media de edad a 35.4, valor más próximo a lo que Naimi *et al.* observaron. Sin embargo, otra característica que muchos grupos de investigación incluyen es la ausencia de multirresistencia, si la hubiéramos considerado como marcador de SARM-AC, la media de edad hubiera vuelto a ascender a

62.66. En definitiva, se necesitan más datos sobre las cepas para poder elucidar su origen, y si existe o no mezcla de aislados comunitarios y hospitalarios en nuestra colección.

Dentro de lo esperado^{191,250,272}, los aislados SARM-AC fueron recuperados en un alto porcentaje de SSTIs (82.10%), y dentro de este grupo, predominaron las infecciones de heridas y úlceras. Estos aislados no mostraron características distintivas con respecto a los recuperados a partir de las demás muestras clínicas. Afortunadamente, ninguno de ellos se encontró causando patología severa en el momento del aislamiento, si bien es verdad, que debido al carácter retrospectivo del estudio, no se pudo hacer seguimiento de las infecciones, por lo que desconocemos el desenlace de las mismas.

Se detectó un amplio abanico de perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, a diferencia de lo observado en Francia, donde todos los aislados presentaron resistencia a oxacilina, kanamicina y tetraciclina, resistencia intermedia a ácido fusídico, y susceptibilidad al resto de los antibióticos testados. Si bien, es verdad, que todos los aislados SARM-AC de dicho estudio, mostraron también homogeneidad en la presencia del PVL y en los patrones de campo pulsado, por lo que debe tratarse de la diseminación en el país del mismo clon¹⁸⁹. Hecho que no ocurre en nuestro estudio, donde, incluso en las cepas PVL⁺ detectamos variabilidad.

En oposición a los datos obtenidos por otros autores para aislados comunitarios^{238,285,378,380,386}, en este trabajo se detectó un alto porcentaje de cepas multirresistentes (60.00%). Frecuentemente, se han asociado las cepas SARM-AC con el SCC*mec* tipo IV o el V, casetes móviles pequeños, que, a parte del gen *mecA*, se asocian a ninguno o pocos determinantes de resistencia antibiótica²³⁸ (Figura 2. 7). Esto, unido a los datos observados en algunos estudios, ha hecho que la no multirresistencia se asuma, en muchos casos, como una característica distintiva de SARM comunitarios^{238,285,378,380,386}. Sin embargo, algunos estudios ya han propuesto que esta condición está cambiando progresivamente, y que las cepas SARM-AC están adquiriendo nuevas resistencias a agentes no β -lactámicos^{136,386}, lo cual explicaría nuestros resultados. De hecho, a pesar de que todos los aislados de este trabajo que portaron el SCC*mec*II fueron multirresistentes, también lo fueron aproximadamente la mitad de los que poseían el SCC*mec*IV (47.83%) y su variante IVA (51.06%). Por lo tanto, la aparición de resistencias en estos aislados, debe corresponderse con la adquisición de otros elementos móviles, independientes del SCC*mec*, como el caso de

la resistencia a altas concentraciones de mupirocina transferida en plásmidos. Una vez más, si restringimos el estudio a los 5 aislados PVL⁺, se cumplirían ambas condiciones, ya que todos son no multirresistentes, portadores del SCC*mecIV*.

Los datos de susceptibilidad antimicrobiana son especialmente importantes, ya que la elección de la terapia empírica es fundamental, pues de ello depende en gran medida el curso de la infección. Retrasos en la aplicación del tratamiento apropiado han llevado a un aumento de la morbilidad, finalizando, también, con un aumento en la mortalidad de los pacientes^{387,388}. Se ha propuesto que la elección de dicho tratamiento empírico debería estar guiada por la severidad de la infección, la presencia de factores de riesgo para SARM-AH, y la prevalencia local de SARM-AC²⁸⁴. En el caso de infecciones severas se ha sugerido el uso de la vancomicina, manteniendo el linezolid como un agente de segunda línea³⁸⁹. Para infecciones que presenten gravedad media, aunque se ha propuesto, aún, como razonable el uso de β -lactámicos³⁸⁹, no creemos que sean convenientes debido a la frecuencia de aislamiento de SARM. La clindamicina también ha sido recomendada como tratamiento de estas infecciones, especialmente para cepas SARM-AC^{285,390}. Sin embargo, tal y como Kaplan recomienda, si el porcentaje de SARM-AC resistentes a la clindamicina en una determinada región es superior a 10-15%, ésta debería descartarse como tratamiento empírico. Ese es precisamente el caso de nuestra comunidad, donde se detectó un 52.60% de resistencia a dicho antibiótico. Una alternativa, podría ser el trimetropima-sulfametoxazol, ya que, hasta el momento, según los resultados presentados aquí, no se ha descrito ninguna cepa resistente a él, y se han observado evidencias de su éxito en el caso de infecciones causadas por SARM-AC³⁹¹. Sin embargo, este antibiótico no debería ser administrado a niños menores de 8 semanas, ni se recomienda a menores de 3 años, por lo que deben barajarse otras alternativas, como el linezolid³⁹². Sin duda, para la elección del tratamiento adecuado es necesario el seguimiento activo de las cepas SARM-AC, incluyendo sus cambios en la susceptibilidad antimicrobiana. Además, se debería agilizar la obtención de un amplio antibiograma para cada aislado infeccioso y su revisión por parte del médico, para poder corregir la terapia si fuera necesario²⁸⁴. Otro aspecto a considerar en cuanto a la terapia, es que se ha sugerido recientemente que los antibióticos que frenan la transducción de las proteínas en esta bacteria, como la clindamicina y el linezolid, podrían disminuir la producción del PVL (Etienne, J. comunicación oral), toxina directamente implicada en la virulencia de la bacteria^{298,299}. Por lo

tanto, determinar la presencia de esta toxina también podría ser determinante en la elección del tratamiento.

La prevalencia de SARM resistentes a mupirocina, en general, varía considerablemente entre estudios, mostrando, en la mayoría de ellos, un ratio inferior al 10%³⁹³⁻⁴⁰². En este trabajo nos centramos únicamente en la resistencia a altos niveles de mupirocina, debido a que la resistencia a bajas concentraciones, en principio, no tiene implicación clínica. Aún con este sesgo, el ratio de aislados resistentes a mupirocina obtenido en el presente trabajo (28.40 %) fue muy superior. Dentro de este porcentaje, la resistencia a altas concentraciones de mupirocina se encontró con mayor frecuencia en aislados con multiresistencia, de 27 portadores del *ileS2*, solo 4 no fueron multiresistentes (Tabla 2. 4). Curiosamente, en estos 4 aislados, la resistencia a mupirocina se detectó junto con la resistencia a ciprofloxacino, presente en la inmensa mayoría de las cepas, probablemente debido al uso extendido de este antibiótico en nuestra comunidad. De hecho, es la terapia empírica administrada en infecciones de orina. Sin embargo, el único aislado SARM recuperado de orina, también resultó resistente a ciprofloxacino, lo que, puede no ser significativo como para alterar el tratamiento empírico en este momento, pero sí debe tenerse en cuenta, y conducirnos a un control dirigido de los antibiogramas obtenidos de todos los aislados procedentes de este tipo de muestras.

Cadilla *et al.* encontraron que entre los aislados multiresistentes portadores del gen *ileS2* la presencia del SCC*mecIV* era mayor⁴⁰³. Nuestros datos corroboran este hallazgo, pues de los 23 aislados multiresistentes *ileS2*⁺, 17 pertenecieron al SCC*mecIV*, fundamentalmente a su variante IVA. Por otro lado, 19 aislados SARM mostraron resistencia a la gentamicina (no intermedia), de los cuales 18 portaban también el gen *ileS2*. Esto podría deberse a que, en estos aislados, ambos determinantes de resistencia sean portados juntos en el mismo plásmido.

En todos los aislados se confirmó la localización plasmídica del gen *ileS2*. El tamaño esperado para los plásmidos era de entre 35-42 kb, pero mediante *Southern blot* la hibridación tuvo lugar en todos los aislados en una banda de, aproximadamente, 23 kb, tratándose probablemente de una forma linearizada del plásmido (Figura 2. 29). En este trabajo se determinó únicamente la localización del gen *ileS2*, no profundizando en la caracterización de los plásmidos portadores de este gen. En consecuencia, desconocemos si entre estos

elementos se encuentran algunos de los 9 tipos ya descritos en el hospital (pMUP1-pMUP9)¹⁷⁸, lo que nos daría idea de si los aislados que los portan han salido al ambiente comunitario.

Hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que se describen dos fenotipos distintos de resistencia a altas concentraciones de mupirocina, con CMI $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ (Figura 2. 28). Para explicar esta diferencia de comportamiento entre cepas, se puede descartar la influencia del linaje genético, ya que ambos fenotipos fueron observados en los distintos CCs en los que se detectó el gen *ileS2* (CC30, CC5 y CC22). De hecho, ya que este gen ha sido descrito en plásmidos variables en cuanto a tamaño y composición génica¹⁹⁰, sería lógico suponer que esta diferencia de expresión se debe a dichas variaciones, fundamentalmente a aquellas que afectan a la expresión del gen. Así por ejemplo, se ha descubierto la presencia de un promotor híbrido en el pGO400, portador del gen *ileS2*, constituido por la IS257 y el promotor nativo del plásmido, el cual activa la transcripción del determinante de resistencia a tetraciclina en mayor medida que el promotor nativo, pudiendo aumentar la expresión de genes vecinos, como el *ileS2*¹⁸⁰. Por ese motivo, se procedió en este trabajo a la realización de una estrategia de PCR en tiempo real, que permitiera analizar la expresión del dicho gen. Las técnicas empleadas de extracción y purificación del ARN ofrecieron resultados satisfactorios, en cuanto a concentración y calidad del ARN. Resultó llamativa la aparición de una doble banda correspondiente al ARNr 16S en algunos aislados (

Figura 2. 30), lo que parece ser una característica concreta de dichos aislados. El primer dato obtenido del análisis mediante PCR en tiempo real apoya los resultados obtenidos por de Oliveira *et al.*, confirmando la expresión constitutiva de gen *ileS2*¹⁸². Además, tal y como esperábamos según la hipótesis planteada, la expresión del gen varió en cada uno de los aislados testados. Aplicando la prueba de U Mann-Whitney, se observó que la diferencia se encontraba en el límite de significación (p valor de 0.058) entre las expresiones del gen *ileS2* de los aislados pertenecientes al fenotipo denominado de densidad incompleta, frente a los de densidad completa. Aunque, al eliminar del análisis el aislado 968, que mostró un resultado discordante con respecto al resto de aislados de su mismo fenotipo, la diferencia entre ambos grupos sí resultó significativa (p valor de 0.10). Si observamos la Figura 2. 32, al fijar la muestra 1003 como referencia, que correspondería con el valor 1 de expresión, todos los aislados con densidad incompleta expresaron dos veces menos el gen *ileS2*, mientras que los aislados con densidad completa lo expresaron, aproximadamente, desde 2 hasta 40 veces más

(Tabla 2. 6). Por lo tanto, podríamos suponer que el fenotipo de resistencia a altas concentraciones de mupirocina depende del nivel de expresión del gen *ileS2*. No obstante, se debe tener en cuenta que los distintos niveles de expresión detectados, además de por la variabilidad del plásmido, también pueden deberse a diferencias en el número de copias. Debido a que los plásmidos conjugativos portadores del *ileS2* están presentes en bajo número de copias¹², nos planteamos asumir una posible diferencia de hasta 5 copias más de este plásmido en los aislados del fenotipo de densidad completa, frente a la muestra de referencia. Teniendo en cuenta dicha diferencia y las desviaciones estándar obtenidas (Tabla 2. 6), podríamos explicar las diferencias de expresión del gen *ileS2* en los aislados 953, 1013, 1032 y 1076 por diferencias en el número de copias, no así en el caso de los aislados 974 y 1000. Por lo tanto, en estos dos aislados, y especialmente en el aislado 1000, cabría esperar que la composición del plásmido portador del gen *ileS2*, incorporara algún elemento que incrementara su expresión, como la presencia de un promotor híbrido con la IS257. No obstante, se necesitan futuros estudios, entre los que se encuentra la determinación del número de copias del plásmido, para extraer conclusiones definitivas. Con respecto al aislado 968, se desconoce el motivo de su baja expresión del gen *ileS2*, la cual es menor incluso que la expresión del gen en los aislados del fenotipo de densidad incompleta. Quizá nuevamente la IS257 pudiera estar ejerciendo influencia sobre su transcripción, solo que en este caso, en el sentido opuesto, como se ha descrito para otras ISs^{25,26}. Nuevamente, se necesitan futuros estudios que permitan establecer conclusiones definitivas.

Con respecto al PVL, éste ha sido detectado frecuentemente en aislados de SARM-AC, incluso ha sido considerado por algunos autores como marcador de estas cepas^{189,190,238,378,380}, sin embargo, en otros trabajos ha sido descrito con baja frecuencia^{268,274}. Estos últimos coinciden con el estudio presentado aquí, en el que el PVL ha sido detectado en aislados SARM con baja frecuencia (5%), sugiriendo que esta toxina no es imprescindible para la expansión de las cepas SARM en la comunidad, como ya ha sido propuesto previamente²⁷⁴. De hecho, teniendo en cuenta que los genes *pvl* proceden de distintos tipos de bacteriófagos que se insertan en el cromosoma de aislados *S. aureus*^{295,296}, no se entiende el mecanismo por el cual esta inserción se debe restringir a *S. aureus* que se encuentren circulando en la comunidad, así como tampoco el hecho de que todas las cepas comunitarias deban portarlo. Sí se ha propuesto su restricción a cepas de SARM portadoras del SCCmecIV, sugiriendo que la presencia de este casete es necesaria para la introducción de los genes *pvl*.

En nuestro estudio, se cumple que todos los aislados PVL⁺ portaron también el SCC*mecIV*. A pesar de su baja frecuencia, debido a que ha sido recientemente asociado con infecciones graves, como la neumonía necrotizante^{190,274,387}, se debería ejercer un control exhaustivo para evitar la expansión en la comunidad de estas cepas potencialmente virulentas. Además, podríamos suponer que dentro de estos aislados, los pertenecientes a las cepas ST22 y ST30 suponen un mayor peligro en el caso de infección, debido a que en ellos se detectó la presencia del PVL, junto con la Hlg- γ . Como ha sido propuesto, las subunidades de estas dos toxinas podrían combinarse dando lugar a 6 tipos distintos de toxinas, aumentando su virulencia²⁴².

Por otro lado, la detección del PVL en linajes genéticos no relacionados, que aquí se observa, ya ha sido descrita con anterioridad^{190,274,378}. Narita *et al.* demostraron que distintas cepas PVL⁺ pueden llevar distintos fagos portadores de los genes *lukS-PV/lukF-PV* codificantes de esta toxina⁴⁰⁴. Sin embargo, se desconoce si estos fagos son capaces de transferirse entre dos cepas distintas, o si por el contrario, todas las cepas PVL⁺ lo son por la inserción en su genoma de algunos de los fagos temperados descritos hasta el momento o transmisión vertical^{177,296}. De este estudio no se puede discernir si los genes *pvl* fueron transferidos entre las 3 cepas distintas en las que fueron detectados, o si tuvieron lugar distintas introducciones de cepas portadoras de estos genes. Teniendo en cuenta que todas las cepas PVL⁺ se localizaron en el sur de la isla, donde es mayor el porcentaje de turismo, proponemos como más probable la segunda opción, coincidiendo con Vandenesch *et al.*, quienes propusieron orígenes múltiples independientes para las cepas PVL⁺¹⁹⁰.

Entre estos aislados PVL⁺ encontramos la cepa ST8-IV, la cual es predominante en Estados Unidos, y actualmente en otros muchos países, y que ha sido introducida en España probablemente debido a la presencia de un número elevado de inmigrantes procedentes de América del Sur^{190,378,380}. En Irlanda, la emergencia de un clon multirresistente PVL⁺ ST8-IV/USA300 ha sido considerada como una situación de alarma que requiere un exhaustivo control⁴⁰⁵. Sin embargo, en nuestro estudio no detectamos el denominado clon Europeo, correspondiente con la cepa PVL⁺ ST80-IV²⁷⁴. De hecho, en algunos países europeos, como Dinamarca o Irlanda, ha habido un importante incremento en cepas PVL⁺ SARM-AC, debido fundamentalmente a este clon^{257,258,268}.

Del mismo modo, entre nuestros aislados detectamos dos tipos *spa* descritos hasta el momento únicamente en Alemania, el t1560 (CC5) y el t2178 (CC22), país de donde procede el mayor porcentaje de turistas en Tenerife. Por lo tanto, estos aislados podrían haber sido introducidos directamente por turistas alemanes en la isla. Esta hipótesis se apoya en otros estudios, donde se ha descrito un aumento de la diversidad de SARM-AC debido a la llegada de personas de países extranjeros^{268,380}.

El aislado SARM perteneciente al nuevo tipo ST, el ST1434, perteneció al CC72, el cual se encuentra relacionado al CC8. De hecho, el tipo *spa* al que se unió, el t148, es un tipo frecuentemente observado en cepas de este CC. Además, resultó ser el paso intermedio, hasta ahora desconocido, entre el ST72 y el ST990, del cual solo se ha descrito un SARM en Estados Unidos (Figura 2. 35).

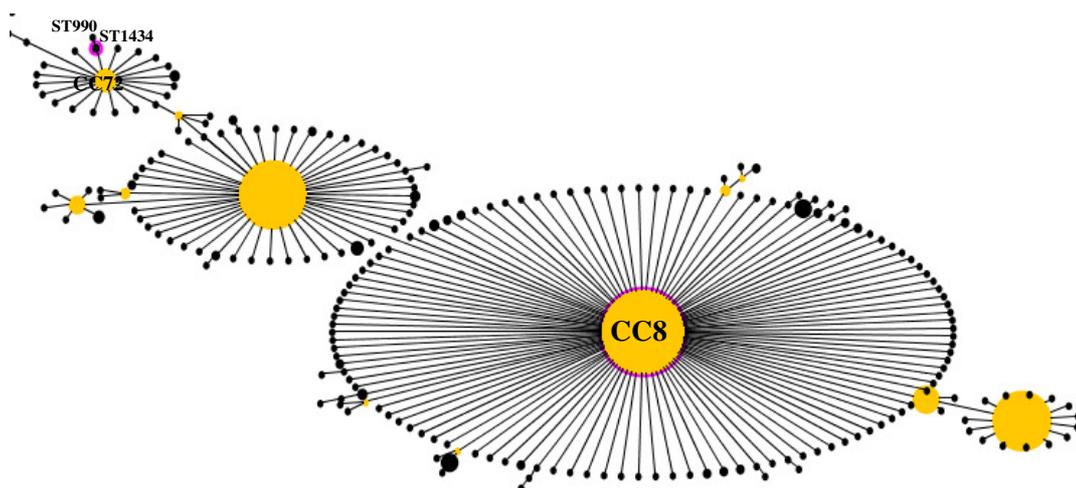


Figura 2. 35. Representación mediante eBURST de la relación entre el CC8 y el CC72. Marcado en rosa se encuentra el nuevo ST, ST1434, intermediario genético entre el ST72 y el ST990.

El 24.20% de nuestros aislados SARM correspondieron con la cepa ST36-II, la cual ha sido detectada previamente en el HUNSC, como clon predominante durante algunos años¹⁸³. Por este motivo, creemos que estos aislados no deben ser considerados SARM-AC, sino SARM-CO, tal y como Salgado *et al.* propusieron²⁸³. El flujo de SARM entre el hospital y la comunidad ya ha sido descrito con anterioridad^{136,189,283}, y, en nuestro caso, éste podría explicar la presencia entre nuestros aislados de esta cepa originalmente hospitalaria. Además, este flujo también explicaría el alto porcentaje de multiresistencia, aunque no el total, y el

pico de infecciones detectado en personas mayores. Si bien la presencia de SARM-AH en la comunidad está bien documentada, ha sido propuesto que su expansión en ella, persona a persona no es sencilla³⁸⁵. Un ejemplo de ello lo observamos con el denominado clon Ibérico, correspondiente con la cepa ST247-IA, el cual ha sido detectado también en nuestro hospital. De hecho, entre los años 1998 y 2000 fue el clon predominante dentro del mismo, hasta que a partir del año 2001 el clon ST36-II lo desplazó como clon predominante en el ambiente hospitalario¹⁸³. La detección del ST36-II en las muestras comunitarias de este estudio, pero no del clon Ibérico, podría indicar que el primero posee mayor facilidad para expandirse, colonizar y mantenerse en distintos ambientes. Lo mismo podría ocurrir con las cepas ST22-IV, ST125-IVA y ST146-IVA detectadas también con anterioridad en el HUNSC¹⁸³, sin embargo, en este caso no podemos discernir sus orígenes, ya que han sido también relacionadas con infecciones comunitarias. Una observación con respecto al aislado PVL⁺ ST22-IV, es que fue indistinguible mediante PFGE de los aislados PVL⁻ de la misma cepa, mientras que el MLVA y la tipificación *spa*, ofrecieron datos con los que se consiguieron diferenciar. Así, aplicando el MLVA los PVL⁻ ST22-IV se agruparon en el tipo c, mientras que el PVL⁺ quedó separado constituyendo el tipo i; de igual forma, mientras que la mayoría de las cepas PVL⁻ ST22-IV presentaron el tipo *spa* t032, el portador del PVL mostró el tipo t005. Esto demuestra la ventaja de emplear diferentes técnicas de tipificación en los estudios epidemiológicos de *S. aureus*.

En general, como vemos en las Figura 2. 33 y Figura 2. 34, encontramos una gran heterogeneidad entre nuestros aislados, con varios clones predominantes y algunos esporádicos. Una observación interesante es la variabilidad que presenta el grupo correspondiente al CC5, donde encontramos 2 STs distintos, 125 y 146, ambos SLV (del inglés *Single-Locus Variant*) del ST5, asociados a una amplia variedad de perfiles de susceptibilidad, PFGE, MLVA y tipos *spa*. Sin embargo, dentro de este grupo han sido descritos aislados portando SCC*mec* tipo I, II, IV y IVA, indicando múltiples adquisiciones de este elemento⁴⁰⁶, mientras que en este estudio se detectó SCC*mec*IVA de forma exclusiva.

Rotundamente, nuestros resultados indican que la identificación de aislados SARM-AC basada exclusivamente en los criterios del CDC, sobrestimó el número de aislados seleccionados, ya que estos criterios incluyeron además aislados SARM-CO. Por lo tanto, la información epidemiológica no es suficiente para discriminar entre SARM hospitalarios y comunitarios, corroborando los datos obtenidos por otros autores^{136,268}. Además, en el año

2000 fue publicado un caso de infección por un SARM-AH adquirido en el transcurso de las primeras 4 horas tras su ingreso³⁸⁵, lo cual hace que pierda valor el criterio del CDC relativo a las 72 horas de admisión.

De acuerdo con David *et al.* la importancia de distinguir entre SARM hospitalarios y comunitarios radica en la toma de decisiones sobre la terapia empírica que aplicar, ya que los aislados de SARM-AC son probablemente más sensibles a la clindamicina¹³⁶. Sin embargo, como se ha visto, entre nuestros aislados comunitarios, la frecuencia de detección de la resistencia a este antibiótico fue alta, por lo que debería ser descartado como tratamiento empírico^{285,390}. Este hecho parece concordar con las observaciones previas de que las cepas SARM-AC cada vez se están pareciendo más a las SARM-AH, y que, actualmente, ambos tipos de cepas se encuentran circulando en ambos ambientes^{136,283}. Además de esto, como se ha expuesto en la introducción, se ha determinado que la colonización por SARM puede persistir desde meses hasta años, por lo que una infección se puede desarrollar en un ambiente distinto a aquel en el que la bacteria fue inicialmente adquirida²⁸³. Por todas estas razones, y para aplicar el tratamiento apropiado y prevenir las infecciones causadas por SARM, es necesario que las guías de prevención y control incluyan, al menos, la determinación del linaje genético, el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y los genes *pvl* para cada aislado clínico.

2.6. CONCLUSIONES

Del presente capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los criterios del CDC admitidos en este momento, sobrestiman la población de SARM-AC, ya que incluyen aislados que se encuentran circulando en la comunidad, pero que poseen un posible origen hospitalario.
2. Los aislados SARM recuperados de la comunidad de Tenerife se asocian más frecuentemente con infecciones de piel y tejidos blandos que con cualquier otro tipo de infección.
3. Un alto porcentaje de los aislados SARM recuperados de nuestra comunidad son multirresistentes, por lo que queda obsoleta la imagen de susceptibilidad que hasta ahora se creía propia de este tipo de muestras.
4. El antibiótico ciprofloxacino debe descartarse como terapia empírica de infecciones causadas por SARM comunitarios, debido al alto porcentaje de resistencia a este antibiótico detectado en Tenerife.
5. Los aislados SARM que presentan resistencia a altos niveles de mupirocina muestran dos comportamientos distintos, los cuales pueden identificarse por el fenotipo mostrado en los experimentos con tiras E-test. En un fenotipo se observa crecimiento en césped en toda la placa, mientras que en el otro, la bacteria crece con dificultad, no llegando a cubrir la placa en su totalidad.
6. El gen *ileS2* se expresa de manera constitutiva, en ausencia de la mupirocina.
7. Los niveles de expresión del gen *ileS2* varían entre aislados, lo que, puede relacionarse con los fenotipos de resistencia observados. Menores niveles de expresión del gen se asocian a dificultad en el crecimiento en presencia de la mupirocina, mientras que mayores niveles de expresión se asocian al fenotipo de crecimiento en césped.
8. La toxina PVL ha sido detectada en baja frecuencia en nuestra comunidad, y su presencia ha sido localizada en el sur de la isla, probablemente como resultado del

turismo o la inmigración, por lo que esa zona debería ser sometida a controles exhaustivos para evitar la expansión de las cepas que la portan.

9. La cepa multirresistente ST36-SCC*mecII*, previamente detectada como mayoritaria en el HUNSC, se encuentra ahora circulando en la comunidad, confirmando con ello el flujo de aislados del hospital a la comunidad.
10. Los datos encontrados en este estudio no encajan con los esperados para muestras SARM comunitarias, por lo que deben plantearse nuevas guías de prevención y control de las infecciones por SARM, teniendo en cuenta los resultados aquí presentados. Para cada aislado clínico debe determinarse, al menos, el linaje genético, el perfil de susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de los genes *pvl*.

2.7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ogston, A.** 1881. Report upon micro-organisms in surgical diseases. *Br. Med. J.* **1**: 369-375.
2. **Euzeby, J.P.** 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 590-592.
3. **Lan, R.T. y P.R. Reeves.** 2000. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends Microbiol.* **8**: 396-401.
4. **Lindsay, J.A. y H.F. Holden.** 2004. *Staphylococcus aureus*: super bug, super genoma? *Trends Microbiol.* **12**:378-385.
5. **Holden, M.T., E.J. Feil, J.A. Lindsay, S.J. Peacock, N.P. Day, M.C. Enright, T.J. Foster, C.E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S.D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B.G. Barrell, B.G. Spratt, J. Parkhill.** 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 9786-9791.
6. **Diep, B.A., S.R. Gill, R.F. Chang, T.F. Phan, J.H. Chen, M.G. Davidson, F. Lin, J. Lin, H.A. Carleton, E.F. Mongodin, G.F. Sensabaugh, F. Perdreau-Remington.** 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **367**: 731-739.
7. **Lindsay, J.A., M.T. Holden.** 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics.* **6**: 186-201.
8. **Robinson, D.A. y M. C. Enright.** 2004. Evolution of *Staphylococcus aureus* by large chromosomal replacements. *J. Bacteriol.* **186**: 1060-1064.

9. **Lacey, R.W.** 1980. Evidence for two mechanisms of plasmid transfer in mixed cultures of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 423-435.
10. **Lyon, B.R., J.W. May, R.A. Skurray.** 1984. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 554-556.
11. **Firth, N. y R.A. Skurray.** 1998. Mobile elements in the evolution and spread of multiple-drug resistance in staphylococci. *Drug Resist. Updates.* **1**: 49-58.
12. **Novick, R.P.** 1990. The *Staphylococcus* as a molecular genetic system, p.1-37. En R.P. Novick (ed), *Molecular Biology of the Staphylococci*. VHC Publishers, New ork, N.Y.
13. **Novick, R.P.** 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 537-565.
14. **Leelaporn, A., N. Firth, I.T. Paulsen, R.A. Skurray.** 1996. IS257-mediated cointegration in the evolution of a family of staphylococcal trimethoprim resistance plasmids. *J. Bacteriol.* **178**: 6070-6073.
15. **Udo, E.E., W.B. Grubb.** 1991. A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **62**: 333-336.
16. **Udo, E.E., W.B. Grubb.** 2001. New *Staphylococcus aureus* incompatibility group 1 plasmids encoding penicillinase production and resistance to different antibacterial agents. *J. Chemother.* **13**: 34-42.
17. **Khan, S.A.** 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 442-445.
18. **Apisiridej, S., A. Leelaporn, C.D. Scaramuzzi, R.A. Skurray, N. Firth.** 1997. Molecular analysis of a mobilizable theta-mode trimethoprim resistance plasmid from coagulase-negative staphylococci. *Plasmid.* **38**: 13-24.
19. **Paulsen, I.T., N. Firth, R.A. Skurray.** 1997. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams, p. 175-212. En K.B. Crossley y G.L. Archer (ed.), *The Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York, N.Y.
20. **Berg, T., N. Firth, S. Apisiridej, A. Hettiaratchi, A. Leelaporn, R.A. Skurray.** 1998. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *J. Bacteriol.* **180**: 4350-4359.

21. **Firth, N., K.P. Ridgway, M.E. Byrne, P.D. Fink, L. Johnson, I.T. Paulsen, R.A. Skurray.** 1993. Analysis of a transfer region from the staphylococcal conjugative plasmid pSK41. *Gene*. **136**: 13-25.
22. **Morton, T.M., D.M. Eaton, J.L. Johnston, G.L. Archer.** 1993. DNA sequence and units of transcription of the conjugative transfer gene complex (*trs*) of *Staphylococcus aureus* plasmid pGO1. *J. Bacteriol.* **175**: 4436-4447.
23. **Macrina, F.L. y G.L. Archer.** 1993. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci and staphylococci, p. 313-329. En D. B. Clewell (ed.), *Bacterial Conjugation*. Plenum Press, New York, N.Y.
24. **Byrne, M.E., D.A. Rouch, R.A. Skurray.** 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene*. **81**: 361-367.
25. **Fiandt, M, Szybalski W, Malamy MH.** 1972. Polar mutations in *lac*, *gal* and phage lambda consist of a few IS-DNA sequences inserted with either orientation. *Mol. Gen. Genet.* **119**: 223-231.
26. **Jansen, A., M. Türck, C. Szekat, M. Nagel, I. Clever, G. Bierbaum.** 2007. Role of insertion elements and *yycFG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **297**: 205-215.
27. **Jaurin, B., S. Normark.** 1983. Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell*. **32**: 809-816.
28. **Rouch, D.A., M.E. Byrne, Y.C. Kong, R.A. Skurray.** 1987. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3039-3052.
29. **Rouch, D.A., L.J. Messerotti, L.S.L. Loo, C.A. Jackson, R.A. Skurray.** 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol. Microbiol.* **3**: 161-175.
30. **Soge, O.O., N.K. Beck, T.M. White, D.B. No, M.C. Roberts.** 2008. A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* *mer* operon. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 674-680.

31. **Lange, C.C., C. Werckenthin, S. Schwarz.** 2003. Molecular analysis of the plasmid-borne *aacA/aphD* resistance gene region of coagulase-negative staphylococci from chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 1397–1401.
32. **Weigel, L.M., D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore, F.C. Tenover.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* **302**: 1569–1571.
33. **Lyon, B.R., R. Skurray.** 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* **51**: 88-134.
34. **Ito, T., K. Okuma, X.X. Ma, H. Yuzawa, K. Hiramatsu.** 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Update.* **6**: 41–52.
35. **Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, T. Ito.** 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology.* **9**: 486-493.
36. **Chongtrakool, P., T. Ito, X.X. Ma, Y. Kondo, S. Trakulsomboon, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, T. Chavalit, J.H. Song, K. Hiramatsu.** 2006. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 1001–1012.
37. **Luong, T.T., S. Ouyang, K. Bush, C.Y. Lee.** 2002. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J. Bacteriol.* **184**: 3623-3629.
38. **Goerke, C., R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B.M. Broker, J. Doskar, C. Wolz.** 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.* **191**: 3462–3468.
39. **Mann, N.H.** 2008. The potential of phages to prevent MRSA infections. *Res. Microbiol.* **159**: 400–405.
40. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Auki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Maimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* **359**: 1819-1827.

41. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. **357**: 1225-1240.
42. **Coleman, D.C., D.J. Sullivan, R.J. Russell, J.P. Arbuthnott, B.F. Carey, H.M. Pomeroy.** 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen Microbiol*. **135**: 1679–1697.
43. **van Wamel, W., S. Rooijackers, M. Ruyken, K. van Kessel, J. van Strijp.** 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.
44. **Szmigielski, S., G. Prevost, H. Monteil, D.A. Colin, J. Jeljaszewicz.** 1999. Leukocidal toxins of staphylococci. *Zentralbl Bakteriolog*. **289**: 185–201.
45. **Novick, R.P.** 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinosis: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. **49**: 93-105.
46. **Gill, S.R., D.E. Fouts, G.L. Archer, E.F. Mongodin, R.T. DeBoy, J. Ravel, I.T. Paulsen, J.F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, R. Madupu, S.V. Angiuoli, A.S. Durkin, D.H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I.R. Hance, K.E. Nelson, C.M. Fraser.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilmproducing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol*. **187**: 2426–2438.
47. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Micro*. **2**: 414–424.

48. **Williams, R.E.O.** 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol. Rev.* **27**: 56–71.
49. **Bradley, S.F., M.S. Terpenning, M.A. Ramsey, L.T. Zarins, K.A. Jorgensen, W.S. Sottile, D.R. Schaberg, C.A. Kauffman.** 1991. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization in a long-term care facility. *Ann. Intern. Med.* **115**: 417–422.
50. **Kluytmans, J., A. Van Belkum, H. Verbrugh.** 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 505–520.
51. **Rohr, U., M. Wilhelm, G. Muhr, S. Gatermann.** 2004. Qualitative and (semi)quantitative characterization of nasal and skin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage of hospitalized patients. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **207**: 51–55.
52. **Nilsson, P., T. Ripa.** 2006. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 3334–3339.
53. **Mertz, D., R. Frei, B. Jaussi, A. Tietz, C. Stebler, U. Flückiger, A.F. Widmer.** 2007. Throat swabs are necessary to reliably detect carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **45**: 475–477.
54. **Sanford, M.D., A.F. Widmer, M.J. Bale, R.N. Jones, R.P. Wenzel.** 1994. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 1123–1128.
55. **Torell, E., D. Molin, E. Tano, C. Ehrenborg, C. Ryden.** 2005. Community-acquired pneumonia and bacteraemia in a healthy young woman caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the genes encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL). *Scand. J. Infect. Dis.* **37**: 902–904.
56. **Marschall, J., K. Muhlemann.** 2006. Duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage, according to risk factors for acquisition. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 1206–1212.
57. **Muder, R.R., C. Brennan, M.M. Wagener, R.M. Vickers, J.D. Rihs, G.A. Hancock, Y.C. Yee, J.M. Miller, V. L. Yu.** 1991. Methicillin-resistant staphylococcal colonization and infection in a long-term care facility. *Ann. Intern. Med.* **114**: 107–112.

58. **Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh, J.L. NouwenL.** 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**: 751-762.
59. **Huang, Y.C., Y.H. Chou, L.H. Su, R.I. Lien, T.Y. Lin.** 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and its association with infection among infants hospitalized in neonatal intensive care units. *Pediatrics.* **118**: 469–474.
60. **Lu, P.L., J.C. Tsai, Y.W. Chiu, F.Y. Chang, Y.W. Chen, C.F. Hsiao, L.K. Siu.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage, infection and transmission in dialysis patients, healthcare workers and their family members. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**: 1659–1665.
61. **Chaberny, I.F., F. Schwab, S. Ziesing, S. Suerbaum, P. Gastmeier.** 2008. Impact of routine surgical ward and intensive care unit admission surveillance cultures on hospital-wide nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a university hospital: an interrupted time-series analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 1422-1429.
62. **Croft, C.A., V.A. Mejia, D.E. Barker, R.A. Maxwell, B.W. Dart, P.W. Smith, R.P. Burns.** 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a trauma population: does colonization predict infection? *Am. Surg.* **75**: 458–461.
63. **Von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, G. Peters.** 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N. Engl. J. Med.* **344**: 11-16.
64. **Lowy, F.D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**: 520-532.
65. **Suzuki, T.** 2011. A new target for *Staphylococcus aureus* associated with keratitis. *Cornea.* **30**: S34-40.
66. **Musser, J.M., V. Kapur.** 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 2058–2063.
67. **Diep, B.A., H.A. Carleton, R.F. Chang, G.F. Sensabaugh, F. Perdreau-Remington.** 2006. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **193**: 1495–1503.

68. **Herron-Olson, L., J.R. Fitzgerald, J.M. Musser, V. Kapur V.** 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. **2**: e1120.
69. **Baba, T., T. Bae, O. Schneewind, F. Takeuchi, K. Hiramatsu.** 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J. Bacteriol.* **190**: 300–310.
70. **Holden, M.T., J.A. Lindsay, C. Corton, M.A. Quail, J.D. Cockfield, S. Pathak, R. Batra, J. Parkhill, S.D. Bentley, J.D. Edgeworth.** 2010. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J. Bacteriol.* **192**: 888–892.
71. **Foster, T.J. y M. Hook.** 1998. Surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**: 484-488.
72. **Dziewanowska, K., A.R. Carson, J.M. Patti, C.F. Deobald, K.W. Bayles, G.A. Bohach.** 2000. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**: 6321-6328.
73. **Arrecubieta, C. y F.D. Lowy.** 2006. *Staphylococcus aureus*-eukaryotic cell interactions. En Fischetti, VA. Editores : R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy y J.I. Rood. Gram-positive pathogens. Washintong, D.C. p. 517-525.
74. **Deisenhofer, J.** 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry.* **20**: 2361-2370.
75. **Gladstone, G.P. y W. E. VanHeyningen.** 1957. Staphylococcal leucocidins. *British journal of experimental pathology.* **38**: 123-137.
76. **O’Riordan, K. y J.C. Lee.** 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 218-234.
77. **Yarwood, J.M. y P.M. Schlievert.** 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **112**: 1620-1625.

78. **Gotz, F.** 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**: 1367–1378.
79. **Vuong, C., F. Gotz, M. Otto.** 2000. Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **68**: 1048–1053.
80. **Wesson, C.A., L.E. Liou, K.M. Todd, G.A. Bohach, Trumble W.R., Bayles, K.W.** 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* **66**: 5238–5243.
81. **Cheung, A.L., K.J. Eberhardt, E. Chung, M.R. Yeaman, P.M. Sullam, M. Ramos, A.S. Bayer.** 1994. Diminished virulence of a *sar*-/*agr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J. Clin. Invest.* **94**: 1815-1822.
82. **Tremaine, M.T., D.K. Brockman, M.J. Betley.** 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expresión is not affected by the accessory gene regulador (*agr*). *Infect. Immun.* **61**: 356-359.
83. **Gaskill, M.E. y S.A. Khan.** 1988. Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **263**: 6276-6280.
84. **Regassa, L.B., J.L. Couch, M.J. Betley.** 1991. Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect. Immun.* **59**: 955-962.
85. **Giraud, A, C. Raspanti, A.Calzolari, R. Nagel.** 1994. Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* **36**: 677-681.
86. **Bronner, S., P. Stoessel, A. Gravet, H. Monteil, G. Prevost.** 2000. Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **669**: 3931-3938.
87. **Saïd-Salim B., B. Mathema, K. Braughton, S. Davis, D. Sinsimer, W. Eisner, Y. Likhoshvay, F.R. Deleo, B.N. Kreiswirth.** 2003. Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot. *J Bacteriol.* **185**: 610–619.
88. **Arvidson, S. y K. Tegmark.** 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 159-170.

89. **Giraud, A.T., A.L. Cheung, R. Nagel.** 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**: 53-58.
90. **Chien, Y., A.C. Manna, S.J. Projan, A.L. Cheung.** 1999. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J. Biol. Chem.* **274**: 37169-37176.
91. **Wolz, C., D. McDevitt, T.J. Foster, A.L. Cheung.** 1996. Influence of agr on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect. Immun.* **64**: 3142-3147.
92. **McAleese, F.M., E.J. Walsh, M. Sieprawska, J. Potempa, T.J. Foster.** 2001. Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **276**: 29969-29978.
93. **Peacock, S.J., C.E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, N.P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**:4987-4996.
94. **Dancer, S.J.** 2008. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 246-253.
95. **Kirby, W.M.M.** 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science.* **99**: 452-453.
96. **Olsen, J.E., H. Christensen, F.M. Aarestrup.** 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 450-460.
97. **Chambers, H.F., F.R. DeLeo.** 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 629-641.
98. **Sidhu, M.S., E. Heir, T. Leegaard, K. Wiger, A. Holck.** 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2797-2803.
99. **Barber, M. y M. Rozwadowska-Dowzenko.** 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet.* **1**: 64164-64164.
100. **Jevons, M.P.** 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. *BMJ.* **1**: 124-125.

101. **Hiramatsu, K.** 1998. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am. J. Med.* **104**: 7S-10S.
102. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**: 565-567.
103. **Centers for Disease Control and Prevention.** 1997. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **46**: 765–766.
104. **Fridkin, S.K., J. Hageman, L.K. McDougal, J. Mohammed, W.R. Jarvis, T.M. Perl, F.C. Tenover; Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Epidemiology Study Group.** 2003. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997–2001. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 429–439.
105. **Chaiwongkarjohn, S., P. Pramyothin, N. Suwantararat, M.J. Bankowski, T. Koyamatsu, S.E. Seifried, E.F. Bello.** 2011. A report on the first case of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) in Hawai'i. *Hawaii Med. J.* **70**: 233-236.
106. **Richter, S.S., S.W. Satola, E.K. Crispell, K.P. Heilmann, C.L. Dohrn, F. Riahi, A.J. Costello, D.J. Diekema, G.V. Doern.** 2011. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 4203-4207.
107. **Thati, V., C.T. Shivannavar, S.M. Gaddad.** 2011. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. *Indian J. Med. Res.* **134**: 704-708.
108. **Sola, C., H. Paganini, A.L. Egea, A.J. Moyano, A. Garnerero, I. Kevric, C. Culasso, A. Vindel; Study Group of CA-MRSA in Children, Argentina-2007, H. Lopardo, J.L. Bocco.** 2012. Spread of Epidemic MRSA-ST5-IV Clone Encoding PVL as a Major Cause of Community Onset Staphylococcal Infections in Argentinean Children. *PLoS One.* **7**: e30487.
109. **Mwangi, M.M., S.W. Wu, Y. Zhou, K. Sieradzki, H. de Lencastre, P. Richardson, D. Bruce, E. Rubin, E. Myers, E.D. Siggia, A. Tomasz.** 2007. Tracking the in vivo

- evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**: 9451–9456.
110. **Hiramatsu, K.** 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* **1**: 147–155.
111. **Lindsay, J.A.** 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 98–103.
112. **Weigel, L.M., D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore, F.C. Tenover .** 2010. Genetic análisis of a high-level vancomicina-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. **302**: 1569-1571.
113. **Courvalin, P.** 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.* **42**: S25–S34.
114. **Pantosti, A., A. Sanchini, M. Monaco.** 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* **2**: 323–334.
115. **Daum, R.S., J.B. Seal.** 2001. Evolving antimicrobial chemotherapy for *Staphylococcus aureus* infections: Our backs to the wall. *Crit. Care Med.* **29** (Suppl. 4): N92-96.
116. **Wenzel, R.P.** 2004. The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values. *N. Engl. J. Med.* **351**: 523-526.
117. **Talbot, G.H., J. Bradley, J.E. Edwards Jr, D. Gilbert, M. Scheld, J.G. Bartlett; Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America.** 2006. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 657-668.
118. **Boucher, H.W., G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett.** 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**: 1-12.
119. **David, M.Z., R.S. Daum.** 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 616-687.

120. **Pinho, M.G., H. de Lencastre, A. Tomasz.** 2001. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 10886–10891.
121. **Ito, T., Y. Katayama, K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1449-1458.
122. **Berger-Bachi, B., S. Rohrer.** 2002. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch. Microbiol.* **178**: 165–171.
123. **Katayama, Y., T. Ito, K. Hiramatsu.** 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1549–1555.
124. **Florescu, I., M. Beuran, R. Dimov, A. Razbaduskas, M. Bochan, G. Fishev, G. Durkart, T. Babinchak, C.A. Cooper, E.J. Ellis-Grosse, N. Dartois, H. Gandjini on behalf of the 307 Study Group.** 2008. Efficacy and safety of tigecycline compared with vancomycin or linezolid for treatment of serious infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant enterococci: a phase 3, multicentre, double-blind, randomized study. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**(Suppl. 1): i17–i28.
125. **Ito, T., X.X. Ma, F. Takeuchi, K. Okuma, H. Yuzawa, K. Hiramatsu.** 1991. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2637-2651.
126. **Leclercq, R.** 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 482–492.
127. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1323-1336.
128. **Oliveira, D.C., A. Tomasz, y H. de Lencastre.** 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.* **7**: 349-361.

129. **Ma, X.X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum y K. Hiramatsu.** 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1147-1152.
130. **Zhang, K., J.A. McClure, S. Elsayed, J.M. Conly.** 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 531–540.
131. **Daskalaki, M., J.R. Otero, F. Sanz, F. Cháves.** 2007. Bacteremia due to clonally derived methicillin-resistant, gentamicin-susceptible isolates and methicillin-susceptible, gentamicin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3446–3448.
132. **Hallin, M., O. Denis, A. Deplano, R. De Mendonça, R. De Ryck, S. Rottiers, M.J. Struelens.** 2007. Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**: 465–472.
133. **Berglund, C., B. Söderquist.** 2008. The origin of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate at a neonatal ward in Sweden—possible horizontal transfer of a staphylococcal cassette chromosome *mec* between methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 1048–1056.
134. **Robinson, D. A., M. C. Enright.** 2003. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3926–3934.
135. **David, M.Z., S.E. Crawford, S. Boyle-Vavra, M.A. Hostetler, D.C. Kim, R.S. Daum.** 2006. Contrasting pediatric and adult methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 631–637.
136. **David, M.Z., D. Glikman, S.E. Crawford, J. Peng, K.J. King, M.A. Hostetler, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum.** 2008. What is community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J. Infect. Dis.* **197**: 1235–1243.

137. **Park, J.Y., J.S. Jin, H.Y. Kang, E.H. Jeong, J.C. Lee, Y.C. Lee, S.Y. Seol, D.T. Cho, J. Kim.** 2007. A comparison of adult and pediatric methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from patients at a university hospital in Korea. *J. Microbiol.* **45**: 447–452.
138. **Nimmo, G.R., G.W. Coombs.** 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**: 401–410.
139. **Huang, Y.C., K.P. Hwang, P.Y. Chen, C.J. Chen, T.Y. Lin.** 2007. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among Taiwanese children in 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3992–3995.
140. **Huang, Y.H., S.P. Tseng, J.M. Hu, J.C. Tsai, P.R. Hsueh, L.J. Teng.** 2007. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 717–724.
141. **Wang, J.L., S.Y. Chen, J.T. Wang, G.H. Wu, W.C. Chiang, P.R. Hsueh, Y.C. Chen, S.C. Chang.** 2008. Comparison of both clinical features and mortality risk associated with bacteremia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **46**: 799–806.
142. **Garnier, F., A. Tristan, B. Francois, J. Etienne, M. Delage-Corre, C. Martin, F. Denis, M.C. Ploy.** 2006. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 498–500.
143. **Gerogianni, I., G. Mpatavanis, K. Gourgoulianis, A. Maniatis, I. Spiliopoulou, E. Petinaki.** 2006. Combination of staphylococcal chromosome cassette SCCmec type V and Panton-Valentine leukocidin genes in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* that caused necrotizing pneumonia in Greece. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**: 213–216.
144. **Chini, V., E. Petinaki, H. Meugnier, A. Foka, M. Bes, J. Etienne, G. Dimitracopoulos, aI. Spiliopoulou.** 2008. Emergence of a new clone carrying Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome mec type V among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *Scand. J. Infect. Dis.* **40**: 368–372.
145. **Oliveira, D.C., C. Milheiriço, H. de Lencastre.** 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3457–3459.

146. **Berglund, C., T. Ito, M. Ikeda, X.X. Ma, B. Soderquist, K. Hiramatsu.** 2008. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3512–3516.
147. **Christianson, S., G.R. Golding, J. Campbell, M.R. Mulvey.** 2007. Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1904–1911
148. **Wisplinghoff, H., A.E. Rosato, M.C. Enright, M. Noto, W. Craig, G.L. Archer.** 2003. Related clones containing SCC*mec* type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3574–3579.
149. **Miragaia, M., I. Couto, H. de Lencastre.** 2005. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb. Drug Resist.* **11**: 83–93.
150. **Mongkolrattanothai, K., S. Boyle, T.V. Murphy, R.S. Daum.** 2004. Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1823–1836.
151. **Wu, S.W., H. de Lencastre, A. Tomasz.** 2001. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**: 2417–2424.
152. **Kreiswirth, B., J. Kornblum, R.D. Arbeit, W. Eisner, J.N. Maslow, A. McGeer, D.E. Low, R.P. Novick.** 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* **259**: 227–230.
153. **Fitzgerald, J.R., D.E. Sturdevant, S.M. Mackie, S.R. Gill, J.M. Musser.** 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 8821–8826.
154. **Enright, M.C., D.A. Robinson, G. Randle, E.J. Feil, H. Grundmann, B. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 7687-7692.

155. **Qi, W., M. Ender, F. O'Brien, A. Imhof, C. Ruef, N. McCallum, B. Berger-Bächi.** 2005. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5164–5170.
156. **Deurenberg, R.H., E.E. Stobberingh.** 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* **8**: 747-763.
157. **Robinson, D.A., A.M. Kearns, A. Holmes, D. Morrison, H. Grundmann, G. Edwards, F.G. O'Brien, F.C. Tenover, L.K. McDougal, A.B. Monk, M.C. Enright.** 2005. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet.* **365**: 1256–1258.
158. **Yanagisawa, T., J.T. Lee, H.C. Wu, M. Kawakami.** 1994. Relationship of protein structure of isoleucyl-tRNA synthetase with pseudomonic acid resistance of *Escherichia coli*. A proposed mode of action of pseudomonic acid as an inhibitor of isoleucyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **269**: 24304–24309.
159. **Rahman, M., W.C. Noble, B. Cookson, D. Baird, J. Coia.** 1987. Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **330**: 387-388.
160. **Eltringham, I.** 1997. Mupirocin resistance and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Hosp. Infect.* **35**: 1–8.
161. **Udo, E.E., L.E. Jacob, B. Mathew.** 2001. Genetic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing high- and low-level mupirocin resistance. *J. Med. Microbiol.* **50**: 909–915.
162. **Antonio, M., N. McFerran, 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**: 438–442.
163. **Hodgeson, J.E., S.P. Curnock, K.G. Dyke, R. Morris, D.R. Sylvester, M.S. Gross.** 1994. Molecular characterization of the gene encoding high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* J2870. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1205–1208.
164. **Ramsey, M.A., S.F. Bradley, C.A. Kauffman, T.M. Morton.** 1996. Identification of chromosomal location of *mupA* gene, encoding low-level mupirocin resistance in staphylococcal isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2820–2823.

165. **Driscoll, D.G., C.L. Young, U.A. Ochsner.** 2007. Transient loss of high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* due to *mupA* polymorphism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2247–2248.
166. **Patel, J.B., R.J. Gorwitz, J.A. Jernigan.** 2009. Mupirocin resistance. *Clin. Infect. Dis.* **49**: 935–941.
167. **Seah, C., D.C. Alexander, L. Louie, A. Simor, D.E. Low, J. Longtin, R.G. Melano.** 2012. *MupB*, a new high-level mupirocin resistance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* In press.
168. **Rahman, M., W.C. Noble, B. Cookson.** 1989. Transmissible mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol. Infect.* **102**: 261–270.
169. **Morton, T.M., J.L. Johnston, J. Patterson, G.L. Archer.** 1995. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1272–1280.
170. **Needham, C., M. Rahman, K.G. Dyke, W.C. Noble.** 1994. An investigation of plasmids from *Staphylococcus aureus* that mediate resistance to mupirocin and tetracycline. *Microbiology.* **140**: 2577–2583.
171. **Udo, E.E., L.E. Jacob.** 1998. Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance and the mobilization of non-conjugative plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* **4**: 185–193.
172. **Woodford, N., A.P. Watson, S. Patel, M. Jevon, D.J. Waghorn, B.D. Cookson.** 1998. Heterogeneous location of the *mupA* high-level mupirocin resistance gene in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **47**: 829–835.
173. **Rahman, M., S. Connolly, W.C. Noble, B. Cookson, I. Phillips.** 1990. Diversity of staphylococci exhibiting high-level resistance to mupirocin. *J. Med. Microbiol.* **33**: 97–100.
174. **Firth, N., R.A. Skurray.** 2006. The *Staphylococcus* genetics: accessory elements and genetic exchange. In Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J. Rood, J.I. Gram-Positive Pathogens. Sociedad Americana de Microbiología. Washington DC, 413–426.

175. **Kwong, S.M., R.A. Skurray, N. Firth.** 2004. *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. *Mol. Microbiol.* **51**: 497-509.
176. **LeBard, R.J., S.O. Jensen, I.A. Arnaiz, R.A. Skurray, N. Firth.** 2008. A multimer resolution system contributes to segregational stability of the prototypical staphylococcal conjugative multiresistance plasmid pSK41. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**: 58-67.
177. **McDougal, L.K., G.E. Fosheim, A. Nicholson, S.N. Bulens, B.M. Limbago, J.E. Shearer, A.O. Summers, J.B. Patel.** 2010. Emergence of resistance among USA300 MRSA isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 3804-3811.
178. **Pérez-Roth, E., C. López-Aguilar, J. Alcoba-Flórez, S. Méndez-Alvarez.** 2006. High-level mupirocin resistance within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic lineages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 3207-11.
179. **Pérez-Roth, E., S.M. Kwong, J. Alcoba-Florez, N. Firth, S. Méndez-Alvarez.** 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**: 2252-2257.
180. **Simpson, A. E., R. A. Skurray, N. Firth.** 2000. An IS257-derived hybrid promoter directs transcription of a *tetA(K)* tetracycline resistance gene in the *Staphylococcus aureus* chromosomal *mec* region. *J. Bacteriol.* **182**: 3345-3352.
181. **Hodgson, J.E., S.P. Curnock, K.G.H. Dyke, R. Morris, D.R. Sylvester, M.S. Gross.** 1994. Molecular characterization of the gene encoding high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* J2870. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1205-1208.
182. **de Oliveira, N.E., E.D. Cavalcanti, M.S. Laport, M. do C. Bastos, M. Giambiagi-deMarval.** 2009. Constitutive expression of the *ileS2* gene responsible for high-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **58**: 1582-1584.
183. **Pérez-Roth, E., F. Lorenzo-Díaz, N. Batista, A. Moreno, S. Méndez-Alvarez S.** 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4649-4656.

184. **Udo, E.E., J.W. Rearman, W.B. Grubb.** 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J. Hosp. Infect.* **25**: 97-108.
185. **Adcock, P.M., P. Pastor, F. Medley, J.E. Patterson, T.V. Murphy.** 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two child care centers. *J. Infect. Dis.* **178**: 577-580.
186. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 1999. Community Associated MRSA Information for Clinicians. Infection control topics. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html.
187. **Fergie, J.E., K. Purcell.** 2001. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in south Texas children. *Pediatr Infect Dis J.* **20**: 860-863.
188. **Groom, A.V., D.H. Wolsey, T.S. Naimi, K. Smith, S. Johnson, D. Boxrud, K.A. Moore, J.E. Cheek.** 2001. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA.* **286**: 1201-1205.
189. **Dufour, P., Y. Gillet, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, D. Floret, J. Etienne, H. Richet.** 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 819-824.
190. **Vandenesch, F., T. Naimi, M.C. Enright, G. Lina, G.R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M.E. Reverdy, J. Etienne.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 978-984.
191. **Buckingham, S.C., L.K. McDougal, L.D. Cathey, K. Comeaux, A.S. Craig, S.K. Fridkin, F.C. Tenover.** 2004. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**: 619-624.
192. **Dietrich, D.W., D.B. Auld, L.A. Mermel.** 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern New England children. *Pediatrics.* **113**: e347-352.

193. Ellis, M.W., D.R. Hospenthal, D.P. Dooley, P.J. Gray, C.K. Murray. 2004. Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 971-979.
194. Zinderman, C.E. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among military recruits. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 941-944.
195. Crum, N.F. 2005. The emergence of severe, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **37**: 651-656.
196. Kazakova, S.V., J.C. Hageman, M. Matava, A. Srinivasan, L. Phelan, B. Garfinkel, T. Boo, S. McAllister, J. Anderson, B. Jensen, D. Dodson, D. Lonsway, L.K. McDougal, M. Arduino, V.J. Fraser, G. Killgore, F.C. Tenover, S. Cody, D.B. Jernigan. 2005. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N. Engl. J. Med.* **352**: 468-475.
197. O'Brien, F.G., Coombs, G.W., Pearman, J.W., Gracey, M., Moss, F., Christiansen, K.J., Grubb, W.B. 2009. Population dynamics of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**: 684-693.
198. Morel, A.S., F. Wu, P. Della-Latta, A. Cronquist, D. Rubinstein, L. Saiman. 2002. Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a mother to her preterm quadruplet infants. *Am. J. Infect. Control.* **30**: 170-173.
199. Healy, C.M., K.G. Hulten, D.L. Palazzi, J.R. Campbell, C.J. Baker. 2004. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 1460-1466.
200. James, L., R.J. Gorwitz, R.C. Jones, J.T. Watson, J.C. Hageman, D.B. Jernigan, Y. Lord, N. Cabelles, C. Cortes, R.G. Golash, J.S. Price, S.I. Gerber. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among healthy full-term newborns. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **93**: F40-F44.
201. Al-Tawfiq, J.A. 2006. Father-to-infant transmission of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 636-637.
202. Sax, H., K. Posfay-Barbe, S. Harbarth, P. Francois, S. Touveneau, C.L. Pessoa-Silva, J. Schrenzel, S. Dharan, A. Gervaix, D. Pittet. 2006. Control of a cluster of

- community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatology. *J. Hosp. Infect.* **63**: 93–100.
203. **Reddy, P., C. Qi, T. Zembower, G.A. Noskin, M. Bolon.** 2007. Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 298–301.
204. **Gastelum, D.T., D. Dassey, L. Mascola, L.M. Yasuda.** 2005. Transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from breast milk in the neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: 1122–1124.
205. **Eckhardt, C., J.S. Halvosa, S.M. Ray, H.M. Blumberg.** 2003. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the neonatal intensive care unit from a patient with community-acquired disease. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**: 460–461.
206. **Bertin, M.L., J. Vinski, S. Schmitt, C. Sabella, L. Danziger-Isakov, M. McHugh, G. W. Procop, G. Hall, S.M. Gorson, J. Goldfarb.** 2006. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit epidemiologically linked to a healthcare worker with chronic otitis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 581–585.
207. **David, M. D., A.M. Kearns, S. Gossain, M. Ganner, A. Holmes.** 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal care unit. *J. Hosp. Infect.* **64**: 244–250.
208. **Méan, M., M.R. Mallaret, P. Andrini, C. Recule, T. Debuon, P. Pavese, J. Croizé.** 2007. A neonatal specialist with recurrent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage implicated in the transmission of MRSA to newborns. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**: 625–628.
209. **Saunders, A., L. Panaro, A. McGeer, A. Rosenthal, D. White, B.M. Willey, D. Gravel, E. Bontovics, B. Yaffe, K. Katz.** 2007. A nosocomial outbreak of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy newborns and postpartum mothers. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**: 128–132.
210. **Nakamura, M.M., K.L. Rohling, M. Shashaty, H. Lu, Y. Tang, K.M. Edwards.** 2002. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in the community pediatric population. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**: 917–921.

211. **Creech, C.B., D.S. Kernodle, A. Alsentzer, C. Wilson, K.M. Edwards.** 2005. Increasing rates of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: 617–621.
212. **Alfaro, C., M. Mascher-Denen, J. Fergie, K. Purcell.** 2006. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients admitted to Driscoll Children's Hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**: 459–461.
213. **Gorwitz, R.J., D. Kruszon-Moran, S.K. McAllister, G.M. McQuillan, L.K. McDougal, G.E. Fosheim, B.J. Jensen, G. Killgore, F.C. Tenover, M. J. Kuehnert.** 2008. Changes in the prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2004. *J. Infect. Dis.* **197**: 1226–1234.
214. **Borchardt, S.M., J.S. Yoder, M.S. Dworkin.** 2005. Is the recent emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among participants in competitive sports limited to participants? *Clin. Infect. Dis.* **40**: 906–907.
215. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among players on a high school football team—New York City, 2007. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **58**: 52–55.
216. **Nguyen, D.M., L. Mascola, E. Bancroft.** 2005. Recurring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a football team. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 526–532.
217. **Hall, A.J., D. Bixler, L.E. Haddy.** 2008. Multiclonal outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a collegiate football team. *Epidemiol. Infect.* **137**: 85–93.
218. **L'Hériteau, F., J. Lucet, A. Scanvic, E. Bouvet.** 1999. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission. *JAMA.* **282**: 1038–1039.
219. **Eveillard, M., Y. Martin, N. Hidri, Y. Boussougant, M. Joly-Guillou.** 2004. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**: 114–120.
220. **Wagenvoort, J.H.T., E.I.G.B. De Brauwier, M.L.H. Sijstermans, H.M.J. Toenbreker.** 2005. Risk of re-introduction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital by intrafamilial spread from and to healthcare workers. *J. Hosp. Infect.* **59**: 67–68.

221. **Health Protection Agency.** 2006. Hospital-associated transmission of Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive community-associated MRSA in the West Midlands. *Commun. Dis. Rep. Wkly.* **16:** 50. <http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2006/cdr5006.pdf>.
222. **Ho, P.L., C. Cheung, G.C. Mak, C.W. Tse, T.K. Ng, C.H. Cheung, T.L. Que, R. Lam, W.M. Lai, R.W. Yung, K.Y. Yuen.** 2006. Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57:** 145–151.
223. **Adam, H., A. McGeer, A. Simor.** 2007. Fatal case of post-influenza community-associated MRSA pneumonia in an Ontario teenager with subsequent familial transmission. *Can. Commun. Dis. Rep.* **33:** 45–48.
224. **Hedin, G., H. Fang.** 2007. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Stockholm, 2000-2003. *Microb. Drug Resist.* **13:** 241–250.
225. **Söderquist, B., C. Berglund.** 2008. Simultaneous presence of an invasive and a carrier strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a family. *Scand. J. Infect. Dis.* **40:** 987–989.
226. **Lee, S.Y., J.Y. Kim, J.H. Kim, S.Y. Kim, C. Park, Y.S. Park, Y.H. Seo, Y.K. Cho.** 2009. A case of primary infective endocarditis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a healthy individual and colonization in the family. *Yonsei Med. J.* **50:** 152–155.
227. **Ozaki, K., M. Takano, W. Higuchi, T. Takano, S. Yabe, Y. Nitahara, A. Nishiyama, T. Yamamoto.** 2009. Genotypes, intrafamilial transmission, and virulence potential of nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from children in the community. *J. Infect. Chermother.* **15:** 84–91.
228. **Pérez-Roth, E., J. Alcoba-Flórez, C. López-Aguilar, I. Gutiérrez-González, B. Rivero-Pérez, S. Méndez-Alvarez.** 2010. Familial furunculosis associated with community-acquired leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST152. *J. Clin. Microbiol.* **48:** 329-332.
229. **Roberts, J.R.** 2007. Lap dancer's lament: an occupational hazard related to community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Emerg. Med.* **49:** 116–117.

230. Gilbert, M., J. MacDonald, D. Gregson, J. Siushansian, K. Zhang, S. Elsayed, K. Laupland, T. Louie, K. Hope, M. Mulvey, J. Gillespie, D. Nielsen, V. Wheeler, M. Louie, A. Honish, G. Keays, J. Conly. 2006. Outbreak in Alberta of community-acquired (USA300) methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people with a history of drug use, homelessness or incarceration. *CMAJ*. **175**: 149–154.
231. Bens, C.C.P.M., A. Voss, C.H.W. Klassen. 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.
232. Lozano, C., C. Aspiroz, M. Ara, E. Gómez-Sanz, M. Zarazaga, C. Torres. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 923-927.
233. Lozano, C., C. Aspiroz, L. Charlez, E. Gómez-Sanz, M. Toledo, M. Zarazaga, C. Torres. 2011. Skin lesion by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398-t1451 in a Spanish pig farmer: possible transmission from animals to humans. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**: 605-607.
234. Morcillo, A., B. Castro, C. Rodríguez-Álvarez, J.C. González, A. Sierra, M.I. Montesinos, R. Abreu, A. Arias. 2012. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs and Pig Workers in Tenerife, Spain. *Foodborne Pathog. Dis.* In press.
235. Cuny, C., R. Nathaus, F. Layer, B. Strommenger, D. Altmann, W. Witte. 2009. Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS One.* **4**: e6800. doi:10.1371/journal.pone.0006800.
236. Pan, A., A. Battisti, A. Zoncada, F. Bernieri, M. Boldini, A. Franco, M. Giorgi, M. Iurescia, S. Lorenzotti, M. Martinotti, M. Monaci, A. Pantosti. 2009. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 845–847.

237. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**: 707-710.
238. **Naimi, T.S., K.H. LeDell, K. Como-Sabetti, S.M. Borchardt, D.J. Boxrud, J. Etienne, S.K. Johnson, F. Vandenesch, S. Fridkin, C. O'Boyle, R.N. Danila, R. Lynfield.** 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.* **290**: 2976-2984.
239. **Epstein, C.R., W.C. Yam, J.S. M. Peiris, R.J. Epstein.** 2009. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 283–285.
240. **Borer, A., J. Gilad, P. Yagupsky, N. Peled, N. Porat, R. Trefler, H. Shprecher-Levy, K. Riesenberg, M. Shipman, F. Schlaeffer.** 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in institutionalized adults with developmental disabilities. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 966–970.
241. **Shopsin, B., B. Mathema, X. Zhao, J. Martinez, J. Kornblum, and B.N. Kreiswirth.** 2000. Resistance rather than virulence selects for the clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for MRSA transmission. *Microb. Drug Resist.* **6**: 239–244.
242. **Lina, G., Y. Piémont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M.O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, J. Etienne.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 1128-1132.
243. **Faria, N.A., D.C. Oliveira, H. Westh, D.L. Monnet, A.R. Larsen, R. Skov, H. de Lencastre.** 2005. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1836-1842.
244. **Pan, E.S., B.A. Diep, E.D. Charlebois, C. Auerswald, H.A. Carleton, G.F. Sensabaugh, F. Perdreau-Remington.** 2005. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--and their relation to community-associated disease activity. *J. Infect. Dis.* **192**: 811-818.

245. **Tenover, F.C., L.K. McDougal, R.V. Goering, G. Killgore, S.J. Projan, J.B. Patel, P.M. Dunman.** 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 108-118.
246. **King, M.D., B.J. Humphrey, Y.F. Wang, E.V. Kourbatova, S.M. Ray, H.M. Blumberg.** 2006. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann. Intern. Med.* **144**: 309–317.
247. **Hota, B., C. Ellenbogen, M.K. Hayden, A. Aroutcheva, T.W. Rice, R.A. Weinstein.** 2007. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft infections at a public hospital: do public housing and incarceration amplify transmission? *Arch. Intern. Med.* **167**: 1026–1033.
248. **Liu, C., C.J. Graber, M. Karr, B.A. Diep, L. Basuino, B.S. Schwartz, M.C. Enright, J. O’Hanlon, J.C. Thomas, F. Perdreau-Remington, S. Gordon, H. Gunthorpe, R. Jacobs, P. Jensen, G. Leoung, J.S. Rumack, H.F. Chambers.** 2008. A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005. *Clin. Infect. Dis.* **46**: 1637–1646.
249. **Gubbay, J.B., I.B. Gosbell, T. Barbagiannakos, A.M. Vickery, J.L. Mercer, M. Watson.** 2008. Clinical features, epidemiology, antimicrobial resistance, and exotoxin genes (including that of Pantone-Valentine leukocidin) of gentamicin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (GS-MRSA) isolated at a paediatric teaching hospital in New South Wales, Australia. *Pathology.* **40**: 64–71.
250. **Munckhof, W.J., G.R. Nimmo, J. Carney, J.M. Schooneveldt, F. Huygens, J. Inman-Bamber, E. Tong, A. Morton, P. Giffard.** 2008. Methicillin-susceptible, non-multidrug resistant and multidrug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a clinical, epidemiological and microbiological comparative study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 355–364.
251. **Coombs, G.W., G.R. Nimmo, J.C. Pearson, K.J. Christiansen, J.M. Bell, P.J. Collignon, M.L. McLaws, the Australian Group for Antimicrobial Resistance.** 2009.

- Prevalence of MRSA strains among *Staphylococcus aureus* isolated from outpatients, 2006. *Commun. Dis. Intell.* **33**: 10–20.
252. **Otter, J.A., G.L. French.** 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in injecting drug users and the homeless in south London. *J. Hosp. Infect.* **69**: 198–200.
253. **Otter, J.A., G.L. French.** 2008. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 670–676.
254. **Tristan, A., M. Bes, H. Meugnier, G. Lina, B. Bozdogan, P. Courvalin, M.E. Reverdy, M.C. Enright, F. Vandenesch, J. Etienne.** 2007. Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 594–600.
255. **Krziwanek, K., C. Luger, B. Sammer, S. Stumvoll, M. Stammler, S. MetzGercek, H. Mittermayer.** 2007. PVL-positive MRSA in Austria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**: 931–935.
256. **Heggelund, L., H.H. Samdal, R. Eggum, T. Jacobsen, T. Bruun, P. Elstrøm.** 2007. Severe case of invasive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Norway. *Euro Surveill.* **12**: pii53304. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId53304>.
257. **Larsen, A.R., S. Bocher, M. Stegger, R. Goering, L.V. Pallesen, R. Skov.** 2008. Epidemiology of European community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 80 type IV strains isolated in Denmark from 1993 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 62–68.
258. **Larsen, A.R., M. Stegger, S. Böcher, M. Sørum, D.L. Monnet, R.L. Skov.** 2009. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 73–78.
259. **Fang, H., G. Hedin, G. Li, C.E. Nord.** 2008. Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Stockholm. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 370–376.

260. **Francois, P., S. Harbarth, A. Huyghe, G. Renzi, M. Bento, A. Gervais, D. Pittet, J. Schrenzel.** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Geneva, Switzerland, 1993-2005. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 304–307.
261. **Niniou, I., S. Vourli, E. Lebessi, M. Fonustoukou, A. Vatopoulos, D. G. Pasparakis, D.A. Kafetzis, M.N. Tsolia.** 2008. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 831–837.
262. **Sdougkos, G., V. Chini, D.A. Papanastasiou, G. Christodoulou, E. Stamatakis, A. Vris, I. Christodoulidi, G. Protopapadakis, I. Spiliopoulou.** 2008. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 995–1001.
263. **Udo, E.E., F.G. O'Brien, N. Al-Sweih, B. Noronha, B. Matthew, W.B. Grubb.** 2008. Genetic lineages of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kuwait hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 3514–3516.
264. **Ben Nejma, M., M. Mastouri, B.B. H. Jrad, M. Nour.** 2008. Characterization of ST80 Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Tunisia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.02.010.
265. **Enany, S., E. Yaoita, Y. Yoshida, M. Enany, T. Yamamoto.** 2010. Molecular characterization of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Egypt. *Microbiol. Res.* **165**: 152–162.
266. **Miklasevics, E., S. Hæggman, A. Balode, B. Sanchez, A. Martinsons, O. Olsson-Liljequist, and U. Dumpis.** 2004. Report on the first PVL-positive community-acquired MRSA strain in Latvia. *Euro Surveill.* **9**: pii5485. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId5485>.
267. **Ribeiro, A., A.Z. Coronado, M.C. Silva-Carvalho, B.T. Ferreira-Carvalho, C. Dias, R. Rozenbaum, P.F. Del Peloso, C.F. Leite, L.A. Teixeira, A.M. Sa' Figueirido.** 2007. Detection and characterization of international community-acquired infections by

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**: 339–345.
268. **Rossney, A.S., A.C. Shore, P.M. Morgan, M.M. Fitzgibbon, B. O’Connell, D.C. Coleman.** 2007. The emergence and importation of diverse genotypes of MRSA harboring the Panton-Valentine leukocidin gene (*pvl*) reveal that *pvl* is a poor marker for community-acquired MRSA in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2554–2563.
269. **Benoit, S.R., C. Estivariz, C. Mogdasy, W. Pedreira, A. Galiana, A. Galiana, H. Bagnulo, R. Gorwitz, G.E. Fosheim, L.K. McDougal, D. Jernigan.** 2008. Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002–2004. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 1216–1223.
270. **Ito, T., M. Iijima, T. Fukushima, M. Nonoyama, M. Ishii, T. Baranovich, T. Otsuka, T. Takano, T. Yamamoto.** 2008. Pediatric pneumonia death caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 1312–1314.
271. **Kilic, A., G. Mert, Z. Senses, O. Bedir, H. Aydogan, A.C. Basustaoglu, P.C. Appelbaum.** 2008. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal isolates from Turkey. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **94**: 615–619.
272. **Naimi, T.S., K.H. LeDell, K. Como-Sabetti, S.M. Borchardt, D.J. Boxrud, J. Etienne, S.K. Johnson, F. Vadenesch, S. Fridkin, C. O’Boyle, R.N. Danila, R. Lynfield.** 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA.* **290**: 2976–2984.
273. **Vandenesch, F., T. Naimi, M.C. Enright, G. Lina, G.R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. Reverdy, J. Etienne.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 978–984.
274. **Holmes, A., M. Ganner, S. McGuane, T.L. Pitt, B.D. Cookson, A.M. Kearns.** 2005. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine Leucocidin genes in England and Wales: Frequency, characterization, and association with clinical disease. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2384-4390.

275. **Gómez, C.H., A.M. Perilla, C. González, S.L. Valderrama, N. Vanegas, B. Chavarro, L.C. Triana, J.R. Támara, C.A. Alvarez.** 2009. Necrotizing pneumonia by community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia. *Biomedica*. **29**:523-530.
276. **Soavi, L., L. Signorini, R. Stellini, A. Acquarolo, B. Fiorese, S. Magri, A. Pantosti, F. Suter, G. Carori.** 2011. Linezolid and clindamycin improve the outcome of severe, necrotizing pneumonia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Infez. Med.* **19**:42-44.
277. **LeBlanc, L., J. Pepin, K. Toulouse, M.F. Oullette, M.A. Coulombe, M.P. Corriveau, M.E. Alary.** 2006. Fluoroquinolones and risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1398–1405.
278. **Tattevin, P., L. Basuino, H.F. Chambers.** 2009. Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and alterations in the SOSmediated response. *Res. Microbiol.* **160**: 187–192.
279. **Schneider-Lindner.** 2007.
280. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2008. Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine—worldwide, 2000-2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **57**: 1148–1151.
281. **Regev-Yochay, G., R. Dagan, M. Raz, Y. Carmeli, B. Shainberg, E. Derazne, G. Rahav, E. Rubinstein.** 2004. Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in children. *JAMA.* **292**: 716–720.
282. **Bogaert, D., J. Nouwn, W. M. Hermans, and A. van Belkum.** 2006. Lack of interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in HIV-infected individuals. *J. Infect. Dis.* **194**:1617–1618.
283. **Salgado, C.D., B.M. Farr, D.P. Calfee.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis.* **36**: 131-139.
284. **Nimmo, G.R., G.W. Coombs, J.C. Pearson, F.G. O'Brien, K.J. Christiansen, J.D. Turnidge, I.B. Gosbell, P. Collignon, M.L. McLaws.** 2006. Methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* in the Australian community: an evolving epidemic. *Med. J. Aust.* **184**: 384-388.
285. **Moran, G.J., R.N. Amii, F.M. Abrahamian, D.A. Talan.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 928-930.
286. **Seybold, U., E.V. Kourbatova, J.G. Johnson, S.J. Halvosa, Y.F. Wang, M.D. King, S.M. Ray, H.M. Blumberg.** 2006. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. *Clin. Infect. Dis.* **42**:647-656.
287. **González, B.E., A.M. Rueda, S.A. Shelburne 3rd, D.M. Musher, R.J. Hamill, K.G. Hulten.** 2006. Community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as the cause of healthcare-associated infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **27**: 1051-1056.
288. **Klevens, R.M., M.A. Morrison, S.K. Fridkin, A. Reingold, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L.H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J.M. Townes, A.S. Craig, G. Fosheim, L.K. McDougal, F.C. Tenover, Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network.** 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1991–1993.
289. **Nygaard, T.K., F.R. DeLeo, J.M. Voyich.** 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: advances toward identifying the key virulence factors. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**: 147–152.
290. **Diep, B.A., A.M. Palazzolo, P. Tattavin, L. Basuino, K.R. Braughton, A.R. Whitney, L. Chen, B.N. Kreiswirth, M. Otto, F.R. Deleo, H.F. Chambers.** 2008. Contribution of Pantón-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One.* **3**: e3198. doi:10.1371/journal.pone.0003198.
291. **Montgomery, C.P., S. Boyle-Vavra, R.S. Daum.** 2009. The arginine catabolic mobile element is not associated with enhanced virulence in experimental invasive disease caused by the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genetic background. *Infect. Immun.* **77**: 2650–2656.

292. **Prévost, G., B. Cribier, P. Couppié, P. Petiau, G. Supersac, V. Finck-Barbançon, H. Monteil, Y. Piémont.** 1995. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* **63**: 4121–4129.
293. **Van de Velde, H.** 1894. Etude sur le mécanisme de la virulence du Staphylocoque pyogène. *Cellule* **10**: 402–460.
294. **Panton, P.N., M.B. Came, F.C.O. Valentine, M.R.C.P. Lond.** 1932. Staphylococcal toxin. *Lancet.* **i**: 506–508.
295. **Canchaya, C., C. Proux, G. Fournous, A. Bruttin, H. Brussow.** 2003. Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 238–276.
296. **Ma, X.X., T. Ito, Y. Kondo, M. Cho, Y. Yoshizawa, J. Kaneko, A. Katai, M. Higashiide, S. Li, K. Hiramatsu.** 2008. Two different Panton-Valentine leukocidin phage lineages predominate in Japan. *J. Clin Microbiol.* **46**: 3246-3258.
297. **Dorgai, L., S. Sloan, R.A. Weisberg.** 1998. Recognition of core binding sites by bacteriophage integrases. *J. Mol. Biol.* **277**: 1059–1070.
298. **Gillet, Y., B. Issartel, P. Vanhems, J.C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piémont, N. Brousse, D. Floret, J. Etienne.** 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* **359**: 753-759.
299. **Diep, B.A., L. Chan, P. Tattevin, O. Kajikawa, T.R. Martin, L. Basuino, T.T. Mai, H. Marbach, K.R. Braughton, A.R. Whitney, D.J. Gardner, X. Fan, C.W. Tseng, G.Y. Liu, C. Badiou, J. Etienne, G. Lina, M.A. Matthay, F.R. DeLeo, H.F. Chambers.** 2010. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **107**: 5587-5592.
300. **Ward, P.D., W.H. Turner.** 1980. Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infect. Immun.* **28**: 393–397.
301. **Cribier, B., G. Prévost, P. Couppie, V. Finck-Barbançon, E. Grosshans, Y. Piémont.** 1992. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology.* **185**: 175–180.

302. **Kaneko, J., Y. Kamio.** 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.
303. **Boyle-Vavra, S., R.S. Daum.** 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine Leukocidin. *Lab. Invest.* **87**: 3-9.
304. **Genestier, A.L., M.C. Michallet, G. Pre´vost, G. Bellot, L. Chalabreysse, S. Peyrol, F. Thivolet, J. Etienne, G. Lina, F.M. Vallette, F. Vandensch, L. Genestier.** 2005. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **115**: 3117–3127.
305. **Dom´ınguez, T.J.** 2004. It’s not a spider bite, it’s community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Board Fam. Pract.* **17**: 220–226.
306. **Vetter, R.S., B.B. Pagac, R.W. Reiland, D.T. Bolesh, D.L. Swanson.** 2006. Skin lesions in barracks: consider community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection instead of spider bites. *Mil. Med.* **171**: 830–832.
307. **Baxtrom, C., T. Mongkolpradit, J.N. Kasimos, L.M. Braune, R.D. Wise, P. Sierwald, K.H. Ramsey.** 2006. Common house spiders are not likely vectors of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J. Med. Entomol.* **43**: 962-965.
308. **Voyich, J.M., M. Otto, B. Mathema, K.R. Braughton, A.R. Whitney, D. Welty, R. D. Long, D.W. Dorward, D.J. Gardner, G. Lina, B.N. Kreiswirth, F.R. DeLeo.** 2006. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* **194**: 1761–1770.
309. **Wardenburg, J.B., T. Bae, M. Otto, F.R. DeLeo, O. Schneewind.** 2007. Poring over pores: a-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat. Med.* **13**: 1405–1406.
310. **Wardenburg, J.B., A.M. Palazzolo-Balance, M. Otto, O. Schneewind, F.R. DeLeo.** 2008. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **198**: 1166–1170.

311. **Labandeira-Rey, M., F. Couzon, S. Boisset, E.L. Brown, M. Bes, Y. Benito, E.M. Barbu, V. Vazquez, M. Höök, J. Etienne, F. Vandenesch, M.G. Bowden.** 2007. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*. **315**: 1130–1133.
312. **Tseng, C.W., P. Kyme, J. Low, M.A. Rocha, R. Alsabeh, L.G. Miller, M. Otto, M. Arditis, B.A. Diep, V. Nizet, T.M. Doherty, D.O. Beenhouer, G.Y. Liu.** 2009. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin contributes to inflammation and muscle tissue injury. *PLoS One*. **4**:e6387. doi:10.1371/journal.pone.0006387.
313. **Hongo, I., T. Baba, K. Oishi, Y. Morimoto, T. Ito, K. Hiramatsu.** 2009. Phenol-soluble modulín a3 enhances the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* **200**: 715–723.
314. **Löffler, B., M. Hussain, M. Grundmeier, M. Brück, D. Holzinger, G. Varga, J. Roth, B.C. Kahl, R.A. Proctor, G. Peters.** 2010. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* **6**: e1000715. doi:10.1371/journal.ppat.1000715.
315. **Varshney, A.K., L.R. Martinez, S.M. Hamilton, A.E. Bryant, M.H. Levi, P. Gialanella, D.L. Stevens, B.C. Fries.** 2010. Augmented production of Panton-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is associated with worse outcome in a murine skin infection model. *J. Infect. Dis.* **201**: 92–96.
316. **O'Hara, F.P., N. Guex, J.M. Word, L.A. Miller, J.A. Becker, S.L. Walsh, N.E. Scangarella, J.M. West, R.M. Shawar, H. Amrine-Madsen.** 2008. A geographic variant of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin toxin and the origin of community-associated methicillin-resistant *S. aureus* USA300. *J. Infect. Dis.* **197**: 187–194.
317. **Dumitrescu, O., A. Tristan, H. Meugnier, M. Bes, M. Gouy, J. Etienne, G. Lina, F. Vandenesch.** 2008. Polymorphism of the *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin genes and its possible link with the fitness of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *J. Infect. Dis.* **198**: 792–794.

318. **John, F.J., J.A. Lindsay.** 2008. Clones and drones: do variants of Panton-Valentine leukocidin extend the reach of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J. Infect. Dis.* **197**: 175–178.
319. **Miller, L.G., F. Perdreau-Remington, G. Rieg, S. Mehdi, J. Perltroth, A.S. Bayer, A.W. Tang, T.O. Phung, B. Spellberg.** 2005. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N. Engl. J. Med.* **352**: 1445–1453.
320. **Boyle-Vavra, S., B. Ereshefsky, C.C. Wang, R.S. Daum.** 2005. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4719–4730.
321. **Coia, J.E., G.J. Duckworth, D.I. Edwards, M. Farrington, C. Fry, H. Humphreys, C. Mallaghan, D.R. Tucker for the Joint Working Party of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy, the Hospital Infection Society, and the Infection Control Nurses Association.** 2006. Guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J. Hosp. Infect.* **63S**: S1–S44.
322. **Siegel, J.D., E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee.** 2006. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>.
323. **Gould, F.K., R. Brindle, P.R. Chadwick, A.P. Fraise, S. Hill, D. Nathwani, G.L. Ridgway, M.J. Spry, R.E. Warren on behalf of the MRSA Working Party of the British Society for Antimicrobial Therapy.** 2009. Guidelines (2008) for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**: 849–861.
324. **Muto, C.A., J.A. Jernigan, B.E. Ostrowsky, H.M. Richet, W.R. Jarvis, J.M. Boyce, B.M. Farr.** 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**: 362–386.

325. **Maclean, M., S.J. MacGregor, J.G. Anderson, G. Woolsey.** 2008. High-intensity narrow-spectrum light inactivation and wavelength sensitivity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**: 227–232.
326. **Scott, E., S. Duty, M. Callahan.** 2008. A pilot study to isolate *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* from environmental surfaces in the home. *Am. J. Infect. Control.* **36**: 458–460.
327. **Kniewl, E., A. Becker, D.H. Forster.** 2005. Bed, bath and beyond: pitfalls in the prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. *J. Hosp. Infect.* **59**: 180–187.
328. **Block, C., E. Robenshtok, A. Simhon, M. Shapiro.** 2000. Evaluation of CHX and povidone iodine activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* using a surface test. *J. Hosp. Infect.* **46**: 147–152.
329. **Lambert, R.J.W.** 2004. Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* between 1989 and 2000. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 699–711.
330. **Gould, I.M., F.M. MacKenzie, G. MacLennan, D. Pacitti, E.J. Watson, D.W. Noble.** 2007. Topical antimicrobials in combination with admission screening and barrier precautions to control endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**: 536–543.
331. **Whitman, T.J., R.K. Herlihy, C.D. Schlett, P.R. Murray, G.A. Grandits, A. Ganesan, M. Brown, J. Mancuso, W.B. Adams, D.R. Tribble.** 2008. Chlorhexidine impregnated cloths to prevent skin and soft tissue infections in Marine officer candidates: a cluster-randomized, double-blind, controlled trial, abstr. L-774. Abstr. *48th Annu. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC)-Infect. Dis. Soc. Am. (IDSA) 46th Annu. Meet.* American Society for Microbiology and Infectious Diseases Society of America, Washington, DC.

332. **Raz, R., D. Miron, R. Colodner, Z. Staler, Z. Samara, Y. Keness.** 1996. A 1-year trial of nasal mupirocin in the prevention of recurrent staphylococcal nasal colonization and skin infection. *Arch. Intern. Med.* **156**: 1109–1112.
333. **van Rijen, M.M.L., M. Bonten, R.P. Wenzel, J.A.J.W. Kluytmans.** 2008. Intranasal mupirocin for the reduction of *Staphylococcus aureus* infections in surgical patients with nasal carriage: a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**: 254–261.
334. **Loeb, M., C. Main, C. Walker-Dilks, A. Eady.** 2003. Antimicrobial drugs for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. Cochrane Database Syst. Rev. **4**: CD003340. doi:10.1002/14651858. CD003340.
335. **Ellis, M.W., M.E. Griffith, D.P. Dooley, J.C. McLean, J.H. Jorgensen, J.E. Patterson, K.A. David, J.S. Hawley, J.A. Regules, R.G. Rivard, P.J. Gray, J. M. Ceremuga, M.A. DeJoseph, D.R. Hospenthal.** 2007. Targeted intranasal mupirocin to prevent colonization and infection by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in soldiers: a cluster randomized controlled trial. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3591–3598.
336. **Graber, C.J., B.S. Schwartz.** 2008. Failure of decolonization in patients with infections due to mupirocin-resistant strains of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**: 284.
337. **Bubeck Wardenburg, J., R.J. Patel, O. Schneewind.** 2007. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect. Immun.* **75**: 1040–1044.
338. **Bubeck Wardenburg, J., O. Schneewind.** 2008. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Exp. Med.* **205**: 287–294.
339. **DeLeo, F.R., M. Otto.** 2008. An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia? *J. Exp. Med.* **205**: 271–274.
340. **Bavaris, S., B. Dyas, R.G. Ulrich.** 1996. Superantigen vaccines: a comparative study of genetically attenuated receptor-binding mutants of staphylococcal enterotoxin A. *J. Infect. Dis.* **174**: 338–345.

341. **Chen, L.B., S. Li, Z.F. Wang, R.L. Chang, J.L. Su, B. Han.** 2012. Protective effect of recombinant staphylococcal enterotoxin A entrapped in polylactic-co-glycolic acid microspheres against *Staphylococcus aureus* infection. *Vet. Res.* **43**: 20.
342. **Lowell, G.H., C. Colleton, D. Frost, R.W. Kaminski, M. Hughes, J. Hatch, C. Hooper, J. Estep, L. Pitt, M. Topper, R.E. Hunt, W. Baker, W.B. Baze.** 1996. Immunogenicity and efficacy against lethal aerosol staphylococcal enterotoxin B challenge in monkeys by intramuscular and respiratory delivery of proteosome-toxoid vaccines. *Infect. Immun.* **64**: 4686–4693.
343. **Lowell, G.H. R.W. Kaminski, S. Grate, R.E. Hunt, C. Charney, S. Zimmer, C. Colleton.** 1996. Intranasal and intramuscular proteosome-staphylococcal enterotoxin B (SEB) toxoid vaccines: immunogenicity and efficacy against lethal SEB intoxication in mice. *Infect. Immun.* **64**: 1706–1713.
344. **Eldrige, J.H., J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley.** 1991. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect. Immun.* **59**: 2978–2986.
345. **Cui, J.C., D.L. Hu, Y.C. Lin, A.D. Qian, A. Nakane.** 2005. Immunization with glutathione S-transferase and mutant toxic shock syndrome toxin 1 fusion protein protects against *Staphylococcus aureus* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**: 45–51.
346. **Dinges, M.M., P.M. Orwin, P.M. Schlievert.** 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* **13**: 16–34.
347. **Theilacker, C., A. Kropec, F. Hammer, I. Sava, D. Wobser, T. Sakinc, J.D. Codée, W.F. Hogendorf, G.A. van der Marel, J. Huebner.** 2012. Protection against *Staphylococcus aureus* by antibody to the polyglycerolphosphate backbone of heterologous lipoteichoic acid. *J. Infect. Dis.* **205**: 1076-1085.
348. **Proctor, R.A.** 2012. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin. Infect. Dis.* **54**: 1179-1186.
349. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI M100-S17. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.*

350. **Mougeot, C., J. Guillaumat-Taillet, J.M. Libert.** 2001. *Staphylococcus aureus*: new detection of intrinsic resistance using the diffusion method. *Pathol. Biol.* **49**: 199-204.
351. **Batista-Díaz, N., I. Gutiérrez-González, M. Lara-Pérez, F. Laich, S. Méndez-Álvarez.** 2008. Evaluación del método de difusión en disco de 30 µg de cefoxitina en la detección de resistencia a meticilina en aislamientos seleccionados de *Staphylococcus aureus*. **21**: 213-216.
352. **Finlay, J.E., L.A. Miller, J.A. Poupard.** 1997. Interpretive criteria for testing susceptibility of *staphylococci* to mupirocin. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **41**: 1137-1139.
353. **Palepou, M.F., A.P. Johnson, B.D. Cookson, H. Beattie, A. Charlett, N. Woodford.** 1998. Evaluation of disc diffusion and Etest for determining the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to mupirocin. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**: 577-583.
354. **Pérez-Roth, E., F. Claverie-Martín, J. Villar y S. Méndez-Alvarez.** 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4037-4041.
355. **Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **74**: 5463-5467.
356. **Sambrook, J. y D.W. Russell.** 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
357. **Holtke, H. J., W. Ankenbauer, K. Muhlegger, R. Rein, G. Sagner, R. Seibl, T. Walter.** 1995. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids—an overview. *Cell. Mol. Biol.* **41**: 883-905.
358. **Schmittgen, T.D., K.J. Livak.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **3**: 1101-1108.
359. **Oliveira, D.C. y H. de Lencastre.** 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2155-2161.

360. **Milheiroço, C, Oliveira DC, de Lencastre H.** 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3374-3377.
361. **McClelland, M., M. Jones, Y. Patel, M. Nelson.** 1987. Restriction endonuclease for pulsed-field mapping of bacterial genomes. *Nucleic. Acids Res.* **15**:5985-6005.
362. **Crossley, K., B. Landsman, D. Zaske.** 1979. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. *J. Infect. Dis.* **139**: 280–287.
363. **Enright, M.C., N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock y B.G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1008-1015.
364. **El Helali, N., A. Carbonne, T. Naas, S. Kerneis, O. Fresco, Y. Giovangrandi, N. Fortineau, P. Nordmann, P. Astagneau.** 2005. Nosocomial outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome in neonates: epidemiological investigation and control. *J. Hosp. Infect.* **61**: 130–138.
365. **Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing y B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.
366. **Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis y J. Potempa.** 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**: 1801-1804.
367. **Rivero-Pérez, B., E. Pérez-Roth, S. Méndez-Alvarez.** 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**: 2991-2994.
368. **Frénay, H.M., A.E. Bunschoten, L.M. Schouls, W.J. van Leeuwen, C.M. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, y F.R. Mooi.** 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.
369. **Guss, B., M. Uhlen, B. Nilsson, M. Lindberg, J. Sjoquist, y J. Sjudahl.** 1984. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur. J. Biochem.* **138**: 413–420.
370. **Schneewind, O., P. Model, y V.A. Fischetti.** 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell.* **70**: 267–281.
371. **von Heijne, G., y M. Uhlen.** 1987. Homology to region X from staphylococcal protein A is not unique to cell surface proteins. *J. Theor. Biol.* **127**: 373–376.
372. **Harmsen, D., H. Claus, W. Witte, J. Rothganger, H. Claus, D. Turnwald, y U. Vogel.** 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5442-5448.
373. **Maiden, M.C., J.A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J.E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D.A. Caugant, I.M. Feavers, M. Achtman, y B.G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 3140–3145.
374. **Jonas, D., H. Grundmann, D. Hartung, F.D. Daschner, K.J. Towner.** 1999. Evaluation of the *mecA femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 880-883.
375. **Anthony, R.M., A.M. Connor, E.G.M. Power, 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.
376. **Broseta, A., F. Cháves, P. Rojo, J.R. Otero.** Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. 2006. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**: 31-35.
377. **Asensio, A., R. Cantón, J. Vaqué, J. Rosselló, F. Calbo, J. García-Caballero, V. Domínguez, A. Hernández, A. Trilla, Epine Working Group.** 2006. Nosocomial and

- community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients (Spain, 1993-2003). *J. Hosp. Infect.* **63**: 465-471.
378. **Cercenado, E., O. Cuevas, M. Marín, E. Bouza, P. Trincado, T. Boquete, B. Padilla, A. Vindel.** 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**: 143-149.
379. **Daskalaki, M.P., P. Rojo, M. Marin-Ferrer, M. Barrios, J.R. Otero, F. Cháves.** 2010. Panton–Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clin. Microbiol. Infec.* **16**: 74-77.
380. **Manzur, A., A.M. Domínguez, M. Pujol, M., M.P. González, E. Limón, A. Hornero, R. Martín, F. Gudiol, J. Ariza.** 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 377-380.
381. **Frick, M.A., F.A. Moraga-Llop, R. Bartolomé, N. Larrosa, M. Campins, Y. Roman, A. Vindel, C. Figueras.** 2010. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **28**: 675-679.
382. **García-Agudo, L., M. Huertas, M.Á. Asencio, R. Carranza, P. García-Martos.** 2011. Antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from outpatient individuals. *Rev. Esp. Quimioter.* **24**: 91-95.
383. **Casado-Verrier, B., C. Gómez-Fernández, J.R. Paño-Pardo, R. Gómez-Gil, J. Mingorance-Cruz, R. Moreno-Alonso de Celada, P. Herranz-Pinto.** 2012. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Madrid: prevalence study. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* In press.
384. **Marimón, J.M., M. Villar, J.M. García-Arenzana, L. Caba Ide, E. Pérez-Trallero.** 2012. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leukocidin genes in northern Spain. *J. Infect.* **64**: 47-53.
385. **Cookson, B.D.** 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community: new battlefronts, or are the battles lost? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **21**: 398-403.

386. **Ribeiro, A., C. Dias, M.C. Silva-Carvalho, L. Berquó, F.A. Ferreira, R.N. Santos, B.T. Ferreira-Carvalho, A.M. Figueiredo.** 2005. First Report of Infection with Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1985-1988.
387. **Peleg, A.Y., W.J. Munckhof.** 2004. Fatal necrotising pneumonia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Med. J. Aust.* **181**: 228-229.
388. **Gosbell, I.B., J.L. Mercer, S.A. Neville, K.G. Chant, R. Munro.** 2001. Community-acquired, non-multiresistant oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (NORSA) in South Western Sydney. *Pathology.* **33**: 206-210.
389. **Zetola, N., J.S. Francis, E.L. Nuermberger, W.R. Bishai.** 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.* **5**: 275-286.
390. **Kaplan, S.L.** 2005. Treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**: 457-458.
391. **Grim, S.A., R.P. Rapp, C.A. Martin, M.E. Evans.** 2005. Trimethoprim-sulfamethoxazole as a viable treatment option for infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy.* **25**: 253-264.
392. **Tan, T.Q.** 2004. Update on the use of linezolid: a pediatric perspective. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**: 955-956.
393. **Deshpande, L.M., A.M. Fix, M.A. Pfaller, R.N. Jones.** 2002. Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000): correlations of results from disk diffusion, Etest and reference dilution methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42**: 283-290.
394. **Perl, T. M., J. J. Cullen, R. P. Wenzel, M. B. Zimmerman, M. A. Pfaller, D. Sheppard, J. Twombly, P. P. French, and L. A. Herwaldt.** 2002. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **346**:1871-1877.
395. **Jones, P.G., T. Sura, M. Harris, A. Strother.** 2003. Mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**: 300-301.

396. **Paterson, D.L., J.D. Rihs, C. Squier, T. Gayowski, A. Sagnimeni, N. Singh.** 2003. Lack of efficacy of mupirocin in the prevention of infections with *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients and candidates. *Transplantation*. **75**: 194–198.
397. **Bischoff, W.E., M.L. Wallis, K.B. Tucker, B.A. Reboussin, R.J. Sherertz.** 2004. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a student community: prevalence, clonal relationships, and risk factors. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**: 485–491.
398. **Jones, J.C., T.J. Rogers, P. Brookmeyer, W.M. Dunne, Jr., G.A. Storch, C.M. Coopersmith, V.J. Fraser, D.K. Warren.** 2007. Mupirocin resistance in patients colonized with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a surgical intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* **45**: 541–547.
399. **Ridenour, G., R. Lampen, J. Federspiel, S. Kritchevsky, E. Wong, and M. Climo.** 2007. Selective use of intranasal mupirocin and chlorhexidine bathing and the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection among intensive care unit patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**:1155–1161.
400. **Mongkolrattanothai, K., P. Mankin, V. Raju, B. Gray.** 2008. Surveillance for mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**: 993–994.
401. **O’Shea, S., L. Cotter, S. Creagh, S. Lydon, B. Lucey.** 2009. Mupirocin resistance among staphylococci: trends in the southern region of Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**: 649–650.
402. **Babu, T., V. Rekasius, J.P. Parada, P. Schreckenberger, M. Challapalli.** 2009. Mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-colonized patients at admission to a tertiary care medical center. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 2279-2280.
403. **Cadilla, A., M.Z. David, R.S. Daum, S. Boyle-Vavra.** 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**: 95-100.
404. **Narita, S., J. Kaneko, J. Chiba, Y. Piemont, S. Jarraud, J. Etienne, Y. Kamio.** 2001. Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT. *Gene.* **268**: 195-206.

405. **Shore, A.C., O.M. Brennan, R. Ehricht, S. Monecke, S. Schwarz, P. Slickers, D.C. Coleman.** 2010. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfrr* in a Panton-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 4978-4984.
406. **Amorim, M.L., N.A. Faria, D.C. Oliveira, C. Vasconcelos, J.C. Cabeda, A.C. Mendes, E. Calado, A.P. Castro, M.H. Ramos, J.M. Amorim, H. de Lencastre.** 2007. Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 2881-2888.

2.8. ANEXOS

2.8.1 Índice de abreviaturas

ACME: *Arginine Catabolic Mobile Element*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

agr: Gen accesorio regulador o *accessory gene regulator*

arcC: Carbamato kinasa

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

aroE: Shikimato deshidrogenasa

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo o *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain Heart Infusion*

BHIA: *Brain Heart Infusion Agar*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CC: Complejo Clonal o *Clonal Complex*

ccr: *Chromosome cassette recombinase*

CDC: Centro para el control y la prevención de enfermedades o *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Ct: *Threshold Cycle*

DEPC: Dietil-pirocarbonato

DIG: Digoxigenina

DS: Desviación estándar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

glpf: Glicerol kinasa

gmk: Guanilato kinasa

Hlg- γ : Gamma-Hemolisina

HUNSC: Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria

IS: Secuencia de Inserción o *Insertion Sequence*

Kb: Kilobases

kDa: kilodalton

LB: Luria Bertani

Mb: Megabases

MLST: *Multi-Locus Sequence Typing*

MLVA: *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat*

MSCRAMM; *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NCTC: Colección Nacional de Cultivos Tipo o *National Collection of Type Cultures*

NIH: *National Institutes of Health*

orf: Pauta de lectura abierta u *Open Reading Frame*

pb: pares de bases

PBP: Proteína de unión de la penicilina o *Penicillin Binding Protein*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*

PEG: Polietilenglicol

PFGE: Electroforesis en campo pulsado o *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*

PMNs: Leucocitos Polimorfonucleares

pta: Fosfato acetiltransferasa

PVL: Leucocidina de Panton-Valentine o *Panton-Valentine Leukocidin*

r.p.m.: Revoluciones por minuto

RT-qPCR: PCR cuantitativa o en tiempo real

SAIV: *S. aureus* con resistencia Intermedia a la Vancomicina.

SaPI: Isla de Patogenicidad de *S. aureus* o *S. aureus Pathogenicity Islands*

SARM: *S. aureus* Resistente a Meticilina

SARM-AC: *S. aureus* Resistente a Meticilina Adquirido en la Comunidad

SARM-AH: *S. aureus* Resistente a Meticilina Adquirido en el Hospital

SARM-CO: *S. aureus* Resistente a Meticilina circulante en la comunidad

SARM-HACO: *S. aureus* Resistente a Meticilina circulante en la comunidad con origen hospitalario.

SARV: *S. aureus* Resistente a Vancomicina.

SASM: *S. aureus* Susceptible a Meticilina

SCC: Casete Cromosómico Estafilococal o *Staphylococcal Cassette Chromosome*

S_D: Coeficiente de Dice

SDS: Dodecilsulfatosódico

SSTI: Infecciones de piel y tejidos blandos o *Skin and Soft Tissue Infections*

ST: Tipo de Secuencia o *Sequence Typing*

TIR: Repeticiones Terminales Invertidas o *Terminal Inverted Repeats*

tpi: Triosa fosfatisomerasa

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*

VNTR: Repeticiones en Tándem en Número Variable o *Variable Number Tandem Repeat*

yqiL: Acetil coenzima A acetiltransferasa

2.8.2 Tablas de cebadores

Tabla 2. 8. Secuencias de los cebadores empleados en la identificación de SARM y en la detección del gen *ileS2*.

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>femB</i>	FemB1	TTACAGAGTAACTGTTACC	651	354
	FemB2	ATACAAATCCAGCACGCTCT		
<i>ileS2</i>	MupA1	TATATTATGCGATGGAAGGTTGG	458	354
	MupA2	AATAAAATCAGCTGGAAAGTGTTG		
<i>mecA</i>	MecA1	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	310	354
	MecA2	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		

Tabla 2. 9. Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación de los genes que codifican para las toxinas PVL y Hlg- γ .

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>pvl</i>	PVLb-F	CCAAGAAGTTTTGTCCAGCA	560	Este estudio
	PVLb-R	TGCAACATCAGATTCCGATAA		
<i>hlg-γ</i>	Hlg1	GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535	Este grupo
	Hlg2	CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG		

Tabla 2. 10. Cebadores empleados para la estrategia de PCR en tiempo real.

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>ileS2</i>	RT-mup.F	CCGTTTGCTCAGCATCATTAA	106	Este estudio
	RT-mup.R	AAAACCAGCCTCTCGTTTGA		
<i>gmk</i>	RT-gmk.F	TGCAAAGCAAGTTAGAAAGA	60	Este estudio
	RT-gmk.R	CTTGAGGTGCTAAGAAAAT		

Tabla 2. 11. Cebadores empleados para la determinación del tipo estructural de SCC $_{mec}$ mediante PCR múltiple.

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplificación (pb)	Referencia
<i>pls</i>	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	359
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
<i>kdp</i>	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	359
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
<i>mecI</i>	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	209	359
	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
<i>dcs</i>	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	359
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
pI258/Tn554	RIF4 F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	359
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
Tn554/orfX	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	359
	RIF5 R13	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
pUB110	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	359
	pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
pT181	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	359
	pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
<i>mecA</i>	MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162	359
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		
<i>ccrC</i>	ccrC F2	GTA CTCTGTTACAATGTTTGG	449	360
	ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		
<i>ccrB</i>	ccrB F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	311	360
	ccrB R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
Region J1	SCC $_{mec}$ VJ1F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	377	360
	SCC $_{mec}$ VJ1R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
Region J1	SCC $_{mec}$ IIIJ1F	CATTTGTGAAACACAGTACG	243	360
	SCC $_{mec}$ IIIJR	GTTATTGAGACTCCTAAAGC		

Tabla 2. 12. Cebadores empleados para la tipificación de los aislados SARM mediante el MLVA.

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>clfA</i>	ClfA-F	GATTCTGACCCAGGTTTCAGA	Variable	366
	ClfA-R	CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT		
<i>clfB</i>	ClfB-F	ATGGTGATTGAGCAGTAAATCC	Variable	366
	ClfB-R	CATTATTTGGTGGTGTAACTCTT		
<i>SdrCDE</i>	SdrCDE-F	GTAACAATTACGGATCATGATG	Variable	366
	SdrCDE-R	TACCTGTTTCTGGTAATGCTTT		
<i>Spa</i>	Spa-F	AGCACCAAAAGAGGAAGACAA	Variable	366
	Spa-R	GTTTAACGACATGTACTCCGT		
<i>Sspa</i>	Sspa-F	ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA	Variable	366
	Sspa-R	TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC		

Tabla 2. 13. Cebadores empleados para la tipificación de los aislados SARM mediante la secuenciación de la proteína A.

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>spa</i>	1095F	GATTCTGACCCAGGTTTCAGA	255	368
	1517R	CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT		

Tabla 2. 14. Cebadores empleados para la amplificación por PCR y secuenciación en el análisis mediante MLST.

Diana génica	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Amplicón (pb)	Referencia
<i>arcC</i>	arcC-up	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	570	363
	arcC-dn	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG		
<i>aroE</i>	aroE-up	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	536	363
	aroE-dn	GGTGTTGTATTAATAACGATATC		
<i>glpf</i>	glpf-up	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	576	363
	glpf-dn	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC		
<i>gmk</i>	gmk-up	ATCGTTTTATCGGGACCATC	488	363
	gmk-dn	TCATTAACTACAACGTAATCGTA		
<i>pta</i>	pta-up	GTTAAAATCGTATTACTGAAGG	575	363
	pta-dn	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA		
<i>tpi</i>	tpi-up	TCGTTTCATTCTGAACGTCGTGAA	475	363
	tpi-dn	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC		
<i>yqiL</i>	yqiL-up	CAGCATAACAGGACACCTATTGGC	598	363
	yqiL-dn	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC		

2.8.3 Publicación relacionada

Author's personal copy

Infection, Genetics and Evolution 12 (2012) 586–590



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Tenerife Island, Spain

Belinda Rivero-Pérez^{a,b}, Julia Alcoba-Florez^c, Sebastián Méndez-Álvarez^{a,b,*}

^a Laboratorio de Biología Molecular, Unidad de Investigació, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^b Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de la Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2011

Received in revised form 7 February 2012

Accepted 14 February 2012

Available online 22 February 2012

Keywords:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Community of Tenerife

Genetic typing

ABSTRACT

With the recent detection of MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) infections in patients lacking health care-related risk factors, the term community-acquired MRSA (CA-MRSA) has been widely recognised. Many cases of CA-MRSA spreading to the community have been described worldwide. The aim of this study was to determine the features of CA-MRSA isolates from Tenerife Island. To this end, one hundred MRSA isolates were collected from eight different health regions, and their molecular features were investigated. This study revealed a wide variety of MRSA clones, including an emergent ST: ST1484 (CC8) and two new spa types: t7575 (ST125) and t7678 (ST22). The PVL genes were found in only five isolates belonging to unrelated lineages, ST8, ST30 and ST22, which could indicate at least three independent introductions of PVL⁺ strains to Tenerife. Moreover, we detected that hospital MRSA clones, like EMRSA-15 and EMRSA-16, had spread to the community and are now circulating in both environments. Therefore, in our study, the CDC's rules were not specific enough to distinguish CA-MRSA from HA-MRSA. Thus, we think that the current epidemiological information is not enough to discriminate between both MRSA, and it is necessary for prevention guidelines to include the routine determination of at least the genetic background, the antimicrobial susceptibility profile, and the PVL genes of each MRSA isolate.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Until the 1980s, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections were described only in patients from different hospitals (HA-MRSA). However, in 1993, the first case was published of an infection caused by this microorganism in a community of the indigenous population of Western Australia (Udo et al., 1993). Since then, many more of these cases have been reported in Native Americans and other specific community groups without health care-related risk factors (Kuzakova et al., 2005; O'Brien et al., 2009); these isolates were designated community-acquired or community-associated MRSA (CA-MRSA).

In 2000, the Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) advocated some guidelines to differentiate between HA-MRSA and CA-MRSA isolates. According to the CDC, an infection is produced by CA-MRSA if the following conditions are met: (1) Diagnosis is performed in an outpatient or inpatient within 48 h after admission to the hospital; (2) The patient has no medical history of MRSA

infection/colonisation; (3) The patient has no medical history in the past year of hospitalisation, surgery or dialysis, admission to a nursing home, skilled nursing facilities and a hospice; and (4) The patient has no permanent indwelling catheters or medical devices that pass through the skin (CDC, 2000). Moreover, several investigation groups have proposed other features to identify CA-MRSA strains. They can frequently cause skin and soft tissues infections (SSTIs) in healthy people, and are susceptible to a whole range of antimicrobial agents, except for β -lactams and, in particular cases, also ciprofloxacin, clindamycin and erythromycin. Also, they show a different pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern than HA-MRSA; carry the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) IV or V; and frequently produce Panton-Valentine leukocidin (PVL) (Naimi et al., 2003). Because different definitions of CA-MRSA are used, the global rate of infection and colonisation by these microbes is difficult to estimate (Salgado et al., 2003), although the number of cases of CA-MRSA infections is increasingly high (Moan et al., 2005; Salgado et al., 2003).

Since the appearance of CA-MRSA strains, infections caused by these microbes have been described worldwide (Dufour et al., 2002; Ribeiro et al., 2005; Takizawa et al., 2005). In Spain, the first study showing the presence of a CA-MRSA strain was published in 2006. This study described some cases of infections in children, in

* Corresponding author at: Unidad de Investigació, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. Del Rosario 100, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain. Tel.: +34 922600000; fax: +34 922600562.

E-mail address: sebastianmendez@ulcc.es (S. Méndez-Álvarez).

which the multilocus sequence typing (MLST) was not determined (Broseta et al., 2006). Then, subsequent studies on CA-MRSA strains in Spain were published, but they selected only PVL⁺ isolates. In these studies, the MLST was determined and the ST5 and ST8 clones were mainly found. Remarkably, the ST80 strain, considered the European clone, was not found or was found in low frequencies in these studies (Cecenado et al., 2008; Cecenado and Ruiz de Gopegui, 2008; Manzur et al., 2008). In a recent study in Madrid, the CA-MRSA isolated from SSTIs in children also belonged to the single clone ST8 (Daskalaki et al., 2010). In Tenerife, the PVL⁺ ST152 CA-MRSA strain, associated with familial fungulosis, has been recently described, but to our knowledge no epidemiological study on CA-MRSA has been performed here (Pérez-Roth et al., 2010). Therefore, our aim was to characterise the emergence and epidemiology of CA-MRSA infections diagnosed in Tenerife.

2. Materials and methods

2.1. Clinical settings and bacterial strains

This study was performed in the Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC), which is a tertiary medical centre in Tenerife, Spain. Tenerife is organised into 31 Health Regions (HRs) which are areas of the island in which each has a regional healthcare centre. All inhabitants are assigned to a healthcare centre depending on where they live. Eight HRs participated in this study: Puerto de la Cruz, Tacoronte, La Laguna, Candelaria, Güímar, Granadilla, Abona and Santa Cruz de Tenerife, where the HUNSC is located (Fig. 1). The healthcare centres of these HRs routinely refer possible infectious samples to the Clinical Microbiology Laboratory in the HUNSC, which then pass them along to the Research Unit those MRSA samples match CA-MRSA according to the CDC's criteria, as previously described. The following clinical and epidemiological data were registered for each CA-MRSA infection case: sex, age, date, specimen, HR, hospitalisation or residency in a long-term facility and history of MRSA. The surveillance period was from July 2004 to May 2007, a period of 34 months.

2.2. Strain characterisation

For each CA-MRSA isolate, susceptibility testing was performed with the automatic Vitek2 system (AST-P599 card) (BioMérieux,

France) according to the manufacturer's instructions for a panel of 10 antibiotics: penicillin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, oxacillin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, mupirocin, teicoplanin and vancomycin. The antimicrobial susceptibility profiles were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Antibiotypes were considered different if at least one difference was observed in the antibiotic resistance profile. Antimicrobial multiresistance was defined as resistance to ≥ 3 different classes of non-beta-lactam antimicrobials. Resistance to oxacillin and mupirocin were estimated by the E test, and the inducible resistance to clindamycin was determined by the D test.

Species identification and methicillin and mupirocin resistance were confirmed by multiplex PCR (Pérez-Roth et al., 2001), as was the presence of the PVL genes (*lukF-PV* and *lukS-PV*) (Ribeiro et al., 2005).

SCCmec type I-IV was detected first by the Oliveira and de Lencastre strategy (Oliveira and de Lencastre, 2002); then, discrimination between SCCmec IV and V was performed as previously described (Milheirico et al., 2007).

All MRSA isolates were typed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) and PFGE and analysed by InfoQuest (version 4.5; Bio-rad) using the Dice coefficient and the unweighted-pair group method with arithmetic means. A similarity coefficient of $\geq 80\%$ was applied to both methods (Rivero-Pérez et al., 2010; Tenover et al., 1995). SpA typing was performed on each MRSA isolate and analysed using the Ridom StaphType software (Ridom GmbH, Germany) (Hammes et al., 2003).

MLST was performed on 29 representative isolates distributed among the PFGE types (Enright et al., 2000). In each PFGE type, the chosen isolates were the predominant subtypes and those with the greatest number of band differences compared with the predominant subtypes. Based on previous studies, we assumed that all MRSA isolates with the same PFGE type belong to the same MLST sequence types (STs) and clonal clusters (CCs) were assigned using the *S. aureus* MLST database (www.mlst.net) hosted by The Imperial College in London, UK.

3. Results

One hundred MRSA isolates, catalogued as CA according to CDC's rules, were collected during the surveillance period. Later, 95 isolates were confirmed as MRSA, but five isolates were found to be methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) owing to the absence of the *mecA* gene. Therefore, they were excluded from the study.

The female-to-male ratio was 1.2, and the median age of the patients was 60.09 years old, with an age range of 4–92 years (standard deviation [SD], ± 18.6 years). By clustering the patients into 10 groups age ranges of 10 years each, a peak was observed in patients whose ages ranged from 71 to 80 years, and another peak was noted between the ages of 31–40 years.

The 95 MRSA isolates were distributed among the 8 HRs, and we observed that the highest number of isolates came from the Santa Cruz and Puerto de la Cruz HRs (Fig. 1). In general, considering the number of people referred to these regional healthcare centres (http://www2.gobiernodecanarias.org/istat/estadisticas/04/salud/A.php?mid=1/istat/estadisticas/salud/la_04_frame.html), the corresponding percentage of the infections sampled that were caused by CA-MRSA was $<0.1\%$ across each region in the study period.

3.1. Infections

Of the 95 MRSA isolates, the majority were associated with SSTIs (82.1%; $n = 79$), distributed among ulcers ($n = 49$), skin le-

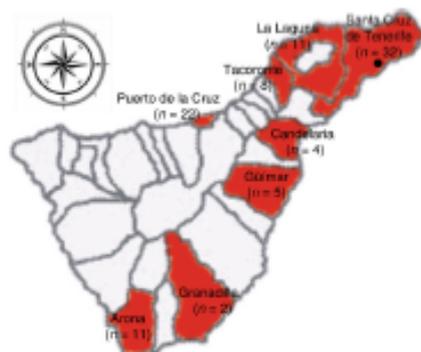


Fig. 1. Health regions of Tenerife. Health regions that participated in this study are colored, and named, and the MRSA number isolated in each (n) is indicated. The dot indicates the location of the HUNSC.

sions ($n = 29$) and abscesses ($n = 1$). The remaining isolates were from otic exudates (6.3%; $n = 6$), nasal exudates (4.2%; $n = 4$), pharynx exudates (3.2%; $n = 3$), sputum (1.1%; $n = 1$), seroma (1.1%; $n = 1$), and urine (1.1%; $n = 1$).

3.2. Antimicrobial susceptibility

Heterogeneous antimicrobial susceptibility phenotypes were determined for CA-MRSA isolates; a total of thirteen different profiles was detected (Table 1). All MRSA isolates were resistant to beta-lactams and susceptible to trimethopim-sulfamethoxazol, teicoplanin and vancomycin. Only one isolate showed inducible resistance to clindamycin. Remarkably, 60% of the isolates were multiresistant, whereas 3.2% were susceptible to all non-beta-lactam antimicrobials.

3.3. PVL

The presence of PVL was investigated in every MRSA isolate, and *pvl* genes were detected in only five MRSA isolates distributed among the CC groups: CC8 ($n = 3$), CC30 ($n = 1$), and CC22 ($n = 1$) (Table 2). Oddly enough, all PVL⁺ CA-MRSA isolates were obtained from Aroca and Guadalupe de Abona, and these HRs can be found in the southern part of the island (Fig. 1).

3.4. Typing

All isolates showed an identifiable SCCmec pattern as detected by the methods used. SCCmec type II was found in 24.2% of the isolates; all of them were multiresistant CC30 (ST36). SCCmec type IV was detected in 26.3% of the isolates distributed between CC22 (ST22), CC8 (ST8), CC97 (ST97), and one CC30 (ST30) isolate. Finally, the SCCmec variant IVA was found in 49.5% of the isolates distributed between CC5 (ST125 and ST146) and one CC8 isolate (ST1434). SCCmec type V was not detected. All SCCmecII MRSA isolates were multiresistant, although 11/25 SCCmecIV isolates and 15/47 SCCmecIVA isolates were also multiresistant.

The MLST clustered the MRSA into five CC groups, including nine MLST types, 15 PFGE types, 12 MLVA types, and 17 *spa* types. The molecular typing data are summarised in Table 2. Group CC5, with 47 isolates, was the most numerous and diverse, having pro-

files that included PFGE, MLVA profiles, and *spa* types, followed by groups CC30 and CC22. The remaining MRSA isolates comprised only 5.3% of the total. Three of the four MRSA isolates belonging to cluster CC8 were ST8, which was related to the PVL⁺ USA300 (TO8) strain, and the remaining one was of the new ST1434 strain, a PVL⁻ variant (t148). The MRSA ST1434 (t148) isolate was obtained from a pharyngeal exudate sample; showed resistance to beta-lactams, clindamycin, erythromycin and induced resistance to ciprofloxacin; and is a single-locus, triple-nucleotide variant of ST72 (CC8) in the gene encoding a cetyl coenzyme A acetyltransferase (*yqiL*), which is the unknown intermediate genetic state between the ST72 and the ST990.

4. Discussion

The emergence of infections caused by CA-MRSA clones is presently the subject of global concern. However, due to the different definitions of CA-MRSA, an open debate exists about whether CA-MRSA must be considered as an epidemiologically independent group from HA-MRSA. In this study, we wanted to research the CA-MRSA strains present in several communities of Tenerife, starting from the minimum required characteristics: the CDC's rules. Although several CA-MRSA epidemiological studies have previously been conducted in Spain, the special characteristics derived from the insularity of the island make it necessary to undertake a specific study here (Boseto et al., 2006; Cerecedo et al., 2008; Daskalaki et al., 2010; Manzur et al., 2008).

The CA-MRSA percentage was found to be low during the period studied, but the real frequency in Tenerife cannot be estimated from this study because the clinical samples sent to the laboratory were from only eight of the 31 HRs (25.8%). A global study in Tenerife, including all the HRs, is necessary due to the wide variety of nationalities located here. Even so, the current data seem to indicate that HA-MRSA strains continue to be a bigger problem than CA-MRSA strains in Tenerife. Although, if we consider other countries as a reference, an increase in these community infections is predictable (Moran et al., 2005).

Among the antimicrobial susceptibility phenotypes, a high percentage of isolates showed multiresistance, which is not expected in community isolates (Cerecedo et al., 2008; Manzur et al., 2008; Moran et al., 2005; Naimi et al., 2003; Ribeiro et al., 2005). However, it has recently been proposed that this condition is progressively changing and CA-MRSA strains are acquiring new resistances (David et al., 2008; Ribeiro et al., 2005).

Controversy exists about the relationship between CA-MRSA strains and PVL. In our study, PVL was found to be low in frequency, suggesting that is not required for the spread of MRSA in this community, as has been previously proposed (Rossety et al., 2007). Conversely, the presence of the PVL in populations with unrelated genetic backgrounds has been described previously (Cerecedo et al., 2008; Holmes et al., 2005; Vandenesch et al., 2003), and in our case, we think that at least three different introductions of PVL-carrying strains have occurred (CC30, CC22, CC8) in the southern part of the island. This hypothesis is in accordance with Vandenesch et al., who proposed multiple independent clonal origins for the PVL⁺ strains, which is supported by the location of these PVL⁺ strains in the HRs strongly exposed to MRSA carriers from around the world (Vandenesch et al., 2003).

Oddly enough, we found the PVL⁺ ST8-IV strain, which is predominant in the USA and was most likely introduced into Spain due to the presence of an elevated number of immigrants from South America (Cerecedo et al., 2008; Manzur et al., 2008; Vandenesch et al., 2003), but we did not find the so-called European clone, the PVL⁺ ST80-IV (Holmes et al., 2005). In some European countries such as Denmark or Ireland, there has been a serious in-

Table 1
Antimicrobial susceptibility profiles of all MRSA isolates.

Profile	ClI	ClP	ClE	ERY	MUP	Isolates ^a
I	S	S	S	S	S	3
II	S	R	S	S	S	23
III	S	S	R	S	S	1 ^d
IV	R	S	S	R	S	1 ^d
V	S	R	S	R	S	6
VI	S	R	S	S	R	4
VII	R	R	S	R	S	33
VIII	S	R	R	S	R	6
IX	S	R	S	R	R	1
X	R	R	S	R	R	4
XI	R	R	R	R	S	1
XII	S	R	R	R	R	1
XIII	R	R	R	R	R	11
X isolates ^b	52.6	94.7	21.1	61.1	28.4	95 ^c

S: Susceptible; R: Resistant; ClI, Clindamycin; ClP, Ciprofloxacin; ERY, Erythromycin; MUP, Mupirocin.
^a Number of MRSA isolates for each antimicrobial susceptibility profile.
^b Total number of MRSA isolates.
^c Percentage of MRSA isolates resistant to each non-beta-lactam antimicrobial tested.
^d Intermediate relation to gentamicin.
^e MRSA isolate that showed inducible resistance to clindamycin.

Table 2
Summary of the molecular typing data for MRSA isolates (n = 95).

CC	ST	SCCmec	PFGE types	MLVA types	Spa types	PVL	Susceptibility profile ^a	
5 (n = 47)	125 (n = 25)	NA	D (n = 13)	b (n = 11)	010 (n = 11)	–	II, VI, VII, VIII, XII	
				d (n = 1)	007 (n = 1)	–	II	
				e (n = 1)	010 (n = 1)	–	II	
			E (n = 7)	d (n = 7)	007 (n = 5)	–	V, VI	
					002 (n = 1)	–	II	
					t7575 (n = 1)	–	II	
				H (n = 2)	d (n = 2)	007 (n = 2)	–	VIII, IX
	K (n = 1)	b (n = 1)	010 (n = 1)	–	VI			
	O (n = 1)	d (n = 1)	007 (n = 1)	–	XIII			
	P (n = 1)	d (n = 1)	007 (n = 1)	–	VIII			
	146 (n = 22)	NA	B (n = 16)	b (n = 14)	010 (n = 12)	–	II, VIII, X, XIII	
					t3753 (n = 1)	–	XIII	
					t7676 (n = 1)	–	VI	
					d (n = 2)	007 (n = 2)	–	II, VIII
g (n = 2)				010 (n = 1)	–	VI		
				t1560 (n = 1)	–	II		
F (n = 4)				b (n = 2)	010 (n = 1)	–	II	
	d (n = 2)	t1560 (n = 1)	–	VI				
		007 (n = 2)	–	II				
30 (n = 24)	36 (n = 23)	E	A (n = 23)	a (n = 23)	021 (n = 21)	–	VI, X, XI, XIII	
					t2009 (n = 1)	–	VI	
					t5140 (n = 1)	–	VI	
22 (n = 19)	30 (n = 1)	M	J (n = 1)	J (n = 1)	021 (n = 1)	+	I	
	22 (n = 15)	M	C (n = 15)	c (n = 13)	032 (n = 12)	–	II, VI, XII	
						0677 (n = 1)	–	II
217 (n = 4)	M	C (n = 4)	c (n = 4)	h (n = 1)	t2781 (n = 1)	–	II	
					l (n = 1)	005 (n = 1)	+	III ^b
8 (n = 4)	8 (n = 3)	M	G (n = 2)	f (n = 2)	008 (n = 2)	+	V	
					H (n = 1)	008 (n = 1)	+	I
				L (n = 1)	l (n = 1)	–	IV ^c	
97 (n = 1)	97 (n = 1)	M	M (n = 1)	k (n = 1)	t259 (n = 1)	–	I	

^a Antimicrobial susceptibility profiles defined in the Table 1.
^b MRSA isolate with intermediate resistance to gentamicin.
^c MRSA isolate that showed inducible resistance to clindamycin.

cease in cases of PVL⁺ CA-MRSA. In the study developed by Faria et al., PVL⁺ genes were detected in 100% of all the cases of ST80-IV isolates (Faria et al., 2005). In Ireland, the emergence of a multidrug-resistant PVL⁺ ST8-MRSA-IVa/USA300 is alarming and requires ongoing surveillance (Shore et al., 2010).

Two spa types described only in Germany until now, t1560 (CC5) and t2781 (CC22), were detected among our isolates, and in Tenerife, the highest percentage of tourists come from Germany. Therefore, these isolates could have been introduced directly by German tourists. This hypothesis is supported by other studies, where the rise of CA-MRSA diversity due to the arrival of individuals from foreign countries has been described (Manzur et al., 2008; Rossney et al., 2007).

Of our isolates, 24.2% corresponded with the ST36-II clone (EMRSA-16), which is the clone previously detected at the HUNSC (Pérez-Roth et al., 2004). Therefore, we think that these isolates should not be considered CA-MRSA, but they should be considered CO-MRSA (community-onset), as Salgado et al. proposed (Salgado et al., 2003). The flow of MRSA between the hospital and community has already been described (David et al., 2008; Dufour et al., 2002; Salgado et al., 2003), and in this case, could explain the presence of the hospital clone ST36-II, the high percentage of multiresistance and the peak of MRSA infections in people from 71 to 90 years of age (Naimi et al., 2003). The ST22-IV clone (EMRSA-15) had also been detected at the HUNSC (Pérez-Roth et al., 2004), but in this case, we cannot discern its origin because it has also been related to community infections.

Clearly, the identification of CA-MRSA isolates in our community based solely on the CDC's criteria overestimated the number of isolates collected because it also included CO-MRSA isolates. Therefore, we think that the epidemiological information is not enough to discriminate between CA-MRSA and HA-MRSA, corroborating data obtained by other authors (David et al., 2008; Rossney et al., 2007). It is possible that a prospective study based on this community would reveal not previously recognised or yet-unknown risk factors. Moreover, according to David et al. the importance of distinguishing between HA-MRSA and CA-MRSA lies in decision making about empirical therapy because CA-MRSA is more likely to be clindamycin susceptible (David et al., 2008). However, among our CA-MRSA isolates, the frequency of clindamycin resistance was high, and this empirical treatment should be discarded by the community (Kaplan, 2005; Moran et al., 2005). This fact seems to agree with the previous observation that the CA-MRSA strains are gradually becoming entrenched as nosocomial pathogens and that both CA-MRSA and HA-MRSA strains now circulate in both environments (David et al., 2008; Salgado et al., 2008). Additionally, it has been determined that MRSA colonisation can persist for months or years, so an infection can develop in a different setting from the one in which the organism was initially acquired (Salgado et al., 2003). For all of these reasons, and to both apply the appropriate treatment and prevent MRSA infections, it is necessary that prevention guidelines include the routine determination of at least the genetic background, antimicrobial susceptibility profile and PVL genes for each MRSA isolate.

Acknowledgments

This work was partially supported by RS06/0002 and RS10/00125 Grants from the Spanish Health Ministry and from RUNCIS 07/28 from the Canarias Government to S.M.A. We thank MAFFRE Foundation and COFARTE, a pharmaceutical company of Tenerife, and RUNCIS for their contribution to the development of this study, partially support of B.R.P.

References

Boneta, A., Cuevas, F., Rolo, P., Otero, J.R., 2006. Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. *Infect. Microbiol. Clin.* 24, 31–35.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), January 2010, posting date. Community associated MRSA information for clinicians. Infection control topics. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html>

Cernado, E., Cuevas, O., Martín, M., Bouza, E., Trincado, P., Bogaerts, T., Padilla, B., Vinde, A., 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Pantón-Valentine leucocidin-positive isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 61, 143–149.

Cernado, E., Ruiz de Gopegui, E., 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Microbiol. Clin.* 26, 19–24.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 17th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (CLSI M100–S17).

Dababneh, M.P., Rolo, P., Marín-Ferrer, M., Barrón, M., Otero, J.R., Cuevas, F., 2010. Pantón-Valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections among children in an emergency department in Madrid, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 74–77.

David, M.Z., Gilman, D., Crawford, S.E., Peng, J., King, K.J., Hostetler, M.A., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., 2008. What is Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J. Infect. Dis.* 197, 1235–1240.

Dubour, P., Gillet, Y., Bea, M., Lina, G., Vandenesch, F., Roret, D., Etienne, J., Richet, H., 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantón-Valentine Leucocidin. *Clin. Infect. Dis.* 35, 819–824.

Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multicentric emergence and typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015.

Etia, N.A., Oliveira, D.C., Weitz, H., Monnet, D.L., Lina, A.R., Skov, R., de Lencastre, H., 2005. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1836–1842.

Hansen, D., Claus, H., Witte, W., Rohde, G., Claus, H., Tümmler, D., Vogel, U., 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5442–5448.

Holmes, A., Garner, M., McGuane, S., Pitt, T.L., Cookson, B.D., Keams, A.M., 2005. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantón-Valentine Leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2384–2390.

Kaplan, S.L., 2005. Treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24, 457–458.

Kuzkova, S.V., Maggioni, J.C., Matava, M., Srinivasan, A., Pheasant, L., Gantikov, B., Box, T., McAllister, S., Anderson, J., Jensen, B., Dodson, D., Lowway, D., McDougall, L.K., Ardino, M., Frazer, V.J., Killgore, G., Tenover, F.C., Cody, S., Jernigan, D.B., 2005. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N. Engl. J. Med.* 352, 468–475.

Manzar, A., Dominguez, A.M., Pujol, M., González, M.P., Limón, E., Herrera, A., Martín, R., Gudol, F., Arbra, J., 2008. Community-acquired methicillin-resistant

Staphylococcus aureus infections: an emerging threat in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 377–380.

Milheirico, C., Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element type in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3374–3377.

Moran, G.J., Anli, R.N., Abrahamian, F.M., Talan, D.A., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 928–930.

Nairn, T.S., LaDei, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boerud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Daniels, R.H., Lynfield, R., 2003. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *JAMA* 290, 2976–2984.

O'Brien, F.G., Coombs, G.W., Pearson, J.W., Grubb, W.B., Moss, F., Christiansen, K.J., Grubb, W.B., 2009. Population dynamics of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in remote communities. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 684–693.

Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural type and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2155–2161.

Pérez-Roth, E., Acosta-Ríos, J., López-Aguilar, C., Riera-Pérez, A., Gutiérrez-González, I., Míndez-Álvarez, S., 2010. A case of familial furunculosis associated to community-acquired leucocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST152. *J. Clin. Microbiol.* 48, 329–332.

Pérez-Roth, E., Clavería-Martín, E., Villar, J., Míndez-Álvarez, S., 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4037–4041.

Pérez-Roth, E., Lorenzo-Bias, E., Balleza, H., Moreno, A., Míndez-Álvarez, S., 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4649–4656.

Ribeiro, A., Dias, C., Silva-Cavallho, M.C., Berquó, I., Ferreira, F.A., Santos, R.N., Ferreira-Cavallho, B.T., Figueiredo, A.M., 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1985–1988.

Riera-Pérez, A., Pérez-Roth, E., Míndez-Álvarez, S., 2010. Evaluation of multiplex 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, 2991–2994.

Rossney, A.S., Shone, A.C., Morgan, P.M., Fitzgerald, M.M., O'Connell, B., Coleman, D.C., 2007. The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Pantón-Valentine leucocidin gene (*pvf*) reveal that *pvf* is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2554–2563.

Salgado, C.D., Barr, B.M., Calfee, D.P., 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis.* 36, 131–139.

Shone, A.C., Brennan, G.M., Ehrlich, R., Monedero, S., Schwaer, S., Slickers, P., Coleman, D.C., 2010. Identification and characterization of the multiple drug resistance gene *cfr* in a Pantón-Valentine leucocidin-positive sequence type II methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4978–4984.

Takizawa, Y., Tanaka, I., Nakagawa, S., Oishi, T., Nishihara, Y., Iwakura, N., Ozaki, K., Takano, M., Nakayama, T., Yamamoto, T., 2005. A Pantón-Valentine leucocidin (PVL) positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3356–3363.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickolts, P.A., Murray, B.E., Reising, D.J., 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.

Udo, E.E., Pearson, J.W., Grubb, W.B., 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J. Hosp. Infect.* 25, 97–108.

Vandenesch, F., Nairn, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Linares, N., Bea, M., Greenlund, T., Beveridge, M.E., Etienne, J., 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantón-Valentine leucocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 978–984.