

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/40
I.S.B.N.: 978-84-15287-72-8

ANA ISABEL MORCILLO REHBERGER

**Estudio epidemiológico de la colonización
de SARM en la cabaña porcina de Tenerife**

Directores

**ÁNGELES ARIAS RODRÍGUEZ
CRISTOBALINA RODRÍGUEZ ÁLVAREZ
ANTONIO SIERRA LÓPEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, hermanos, amigos, a Romén,
quienes con su confianza, ayuda, y dosis de paciencia
han hecho posible que pueda ir cumpliendo
día a día cada uno de mis sueños.*

*Gracias por darme todo
sin esperar nada a cambio,
por disfrutar y sufrir conmigo,
por enseñarme a vivir.*

...No os cambio por nada.

A mis directores de tesis, por su tiempo,
conocimientos y estímulo constantes.

Estoy en deuda con ellas.

A todas aquellas personas que me han prestado
su colaboración sin pedir nada a cambio.

Índice

I. REVISIÓN Y ANTECEDENTES	19
1. Género <i>Staphylococcus</i>	21
2. Especie <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3. Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a los antibióticos	25
3.1. Generalidades	25
3.2. Resistencia a glicopéptidos	26
3.3. Mecanismos de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	26
3.4. Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas	27
3.5. Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos	27
3.6. Mecanismos de resistencia a oxazolidinona	27
3.7. Resistencia a β -lactámicos	28
3.8. Metilina	29
4. Procesos infecciosos relacionados con <i>SARM</i>	32
4.1. Patogenia de las infecciones producidas por <i>Staphylococcus aureus</i>	32
4.2. Componentes de la pared celular	33
4.3. Enzimas	33
4.4. Toxinas	34
4.5. Infecciones más frecuentes	34
4.5.1. Bacteriemia	34
4.5.2. Infección respiratoria	35
4.5.3. Infección de piel y partes blandas	35
4.5.4. Infecciones osteoarticulares	36
4.5.5. Infección de sitio quirúrgico	36
4.5.6. Infección del tracto urinario (ITU).	37
5. Epidemiología del <i>SARM</i>	38
5.1. Historia y evolución del <i>SARM</i>	38
5.2. Reservorios	41
5.2.1. Reservorio humano	41

5.2.2. Reservorio ambiental	42
5.2.3. Reservorio animal	42
5.3. Mecanismo de transmisión	44
5.4. Huésped susceptible	45
6. Situación actual del <i>SARM</i>	46
7. Vigilancia activa	51
8. Métodos para la detección del <i>SARM</i>	52
8.1. Medios de cultivos	52
8.2. Métodos moleculares.	52
8.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
8.2.2. Tipificación molecular de microorganismos. Electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)	53
9. Control del consumo de antimicrobianos y política de antibióticos	54
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	55
1. Justificación	57
2. Objetivos	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. Introducción	63
2. Distribución y tamaño de las granjas	64
3. Muestras de origen animal.	66
4. Muestras de origen humano.	67
5. Toma de muestra.	68
5.1. Muestras de origen animal	68
5.2. Muestras de origen humano	68
6. Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	69
6.1. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> (SLIDEX STAPH PLUS)	70
6.2. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina (MRSA-SCREEN)	71
7. Extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).	72
8. Amplificación del gen <i>mecA</i>	73
9. Amplificación del cassette cromosómico estafilocócico (<i>SCCmec</i>)	75
10. Estudio de genotipado. Electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)	77
10.1. Siembra en placa	77
10.2. Preparación del inóculo	78
10.3. Extracción del adn cromosómico.	78
10.4. Preparación de los insertos.	78
10.5. Lisis celular	79
10.6. Lavado de los insertos	79
10.7. Digestión enzimática de los insertos (macrorrestricción)	79
10.8. Preparación del gel de agarosa.	80
10.9. Colocación en el sistema CHEF-DRIII	80
10.10. Extracción del gel y tinción	81
10.11. Análisis de las imágenes obtenidas	81
11. Secuenciación automática y tipificación de secuencias de locus múltiples (MLST).	83
11.1. Amplificación de alelos de genes <i>housekeeping</i>	83
11.2. Purificación enzimática del producto de PCR (EXO1-SAP)	85

11.3. Reacción de secuenciación	85
11.4. Purificación de la reacción de secuenciación	86
11.5. Asignación, interpretación y comparación de las secuencias de locus múltiples (MLST)	87
12. Estudio de la resistencia antimicrobiana	88
13. Composición de los reactivos	90
14. Análisis estadístico	94
IV. RESULTADOS	95
1. Aislamiento de <i>SARM</i> en muestras nasales de cerdos	97
1.1. Cerdos de cebo	98
1.2. Lechones	99
2. Aislamiento de <i>SARM</i> en cerdos según tamaño de granja	100
2.1. Cerdos de cebo	100
2.2. Lechones	100
3. Estudio de genotipado de cepas procedentes de cerdos.	101
3.1. Cepas procedentes del total de cerdos.	101
3.2. Cepas procedentes de cerdos de cebo.	103
3.3. Lechones	104
4. Resistencia antibiótica de las cepas procedentes de cerdos	106
4.1. Total de muestras.	106
4.2. Resistencia a los antibióticos según <i>SCCmec</i>	107
4.3. Cerdos de cebo	109
4.4. Lechones	110
5. Patrones de resistencia en el total de muestras	111
6. Aislamiento e identificación de <i>SARM</i> en trabajadores del sector porcino	111
6.1. Aislamiento de <i>SARM</i> en trabajadores del sector porcino	113
6.2. Estudio de genotipado de las cepas aisladas en trabajadores del sector porcino	114
6.3. Estudio de resistencia antibiótica en cepas aisladas en trabajadores del sector porcino	115
6.4. Patrones de resistencia en los <i>SARM</i> aislados de trabajadores del sector porcino	115
V. DISCUSIÓN	117
1. Aislamiento de <i>SARM</i> en muestras nasales procedentes de cerdos	117
1.1. Prevalencia del aislamiento de <i>SARM</i> en cerdos.	119
2. Aislamiento de <i>SARM</i> en cerdos según grupos de edad	123
3. Estudio de genotipado de <i>SARM</i> de muestras procedentes de cerdos	124
4. Resistencia antibiótica de las cepas procedentes de cerdos	126
5. Aislamiento, identificación y tipificación de las <i>SARM</i> procedentes de trabajadores del sector porcino	130
6. Resistencia a los antibióticos de <i>SARM</i> aislados en trabajadores del sector porcino	135
VI. CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA.	141

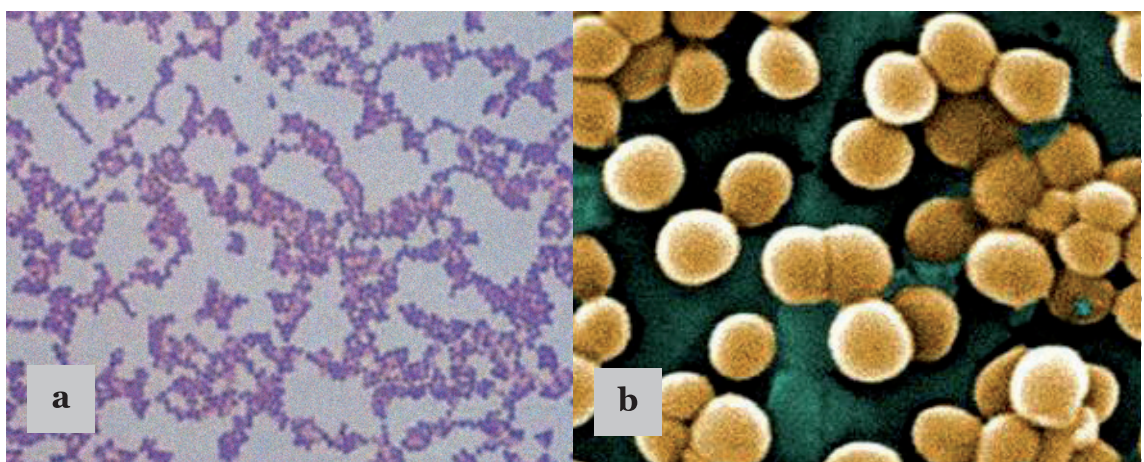
I. Revisión y Antecedentes

1. Género *Staphylococcus*

El término *Staphylococcus* viene del griego *Staphyle* = racimo y *kokkos* = granos, denominación inicialmente otorgada por Ogston hacia 1880, aunque tanto Koch como Pasteur ya lo habían observado.

Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos Gram-positivos aislados o formando parejas, tétradas, cadenas cortas y grupos a modo de racimos irregulares (figura 1.1), debido a su capacidad de división celular en tres planos perpendiculares sucesivos y a que las células hijas no se separan completamente. Los estafilococos son bacterias aerobias o anaerobias facultativas, inmóviles y no formadoras de esporas que generalmente no poseen cápsula.

Figura 1.1– (a) Tinción de Gram de *Staphylococcus*. (b) Imagen de microscopio electrónico. En ambos casos puede observarse su agrupación formando tétradas.



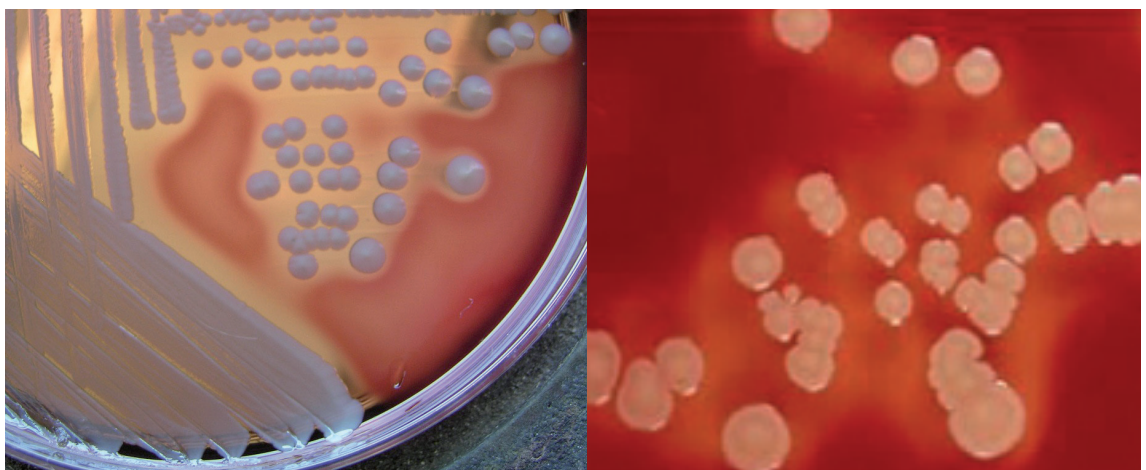
que poseen características únicas si se comparan con sus congéneres menos virulentos. Entre estas características se incluyen la producción de la enzima coagulasa y el factor de afinidad por el fibrinógeno que tienen valor diagnóstico en el laboratorio puesto que ayudan a discriminar entre los estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*) y los estafilococos coagulasa negativos. (Mandell, 2006).

2.

Especie *Staphylococcus aureus*

La especie *Staphylococcus aureus* o “estafilococo dorado” se caracteriza por un rápido crecimiento en agar sangre y otros medios sólidos no selectivos (figura 1.2). Las colonias individuales son lisas, opacas y convexas, con un diámetro de 1 a 3 mm dentro de las primeras 24 horas de cultivo. En ciertas condiciones, la pigmentación amarillenta o dorada clásica causada por los carotenoides no se distingue con facilidad, pero esta pigmentación puede estimularse mediante una incubación adicional a temperatura ambiente y con luz diurna durante 24–48 horas. El *Staphylococcus aureus* es β -hemolítico (figura 1.2), es decir, destruye por completo los eritrocitos.

Figura 1.2– Colonias de *S. aureus* en agar sangre.



Es un microorganismo anaerobio facultativo, mesófilo, requiere de aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa y el manitol con producción de ácido, y tolera rangos de pH y temperaturas muy amplios. Del mismo modo, tolera concentraciones

salinas de hasta un 20% de cloruro sódico permitiendo emplear esta característica para su aislamiento selectivo.

Puede producir una amplia variedad de enfermedades, desde infecciones cutáneas relativamente benignas, como foliculitis y forunculosis, hasta enfermedades profundamente arraigadas y con gran riesgo para el paciente como son la osteomielitis, neumonía y endocarditis (Gordon y Lowy, 2008). La lesión anatómica básica inducida por el *S. aureus* es un exudado piógeno o un absceso.

Además de producir muchos tipos de infecciones en las que el microorganismo está físicamente presente en el propio lugar de la infección, también el *Staphylococcus aureus* es capaz de producir enfermedades a distancia mediadas por secreción de toxinas (toxemia o toxinosis). La disección genética y molecular de *Staphylococcus aureus* ha revelado un gran número de adhesinas de superficies que intervienen en la adherencia y colonización de los tejidos dianas (Mandell, 2006).

En el ser humano el *Staphylococcus aureus* muestra preferencia por la región anterior de las fosas nasales, en especial en los adultos, pudiendo existir como residente o como miembro transitorio de la flora normal. Las tasas de portadores nasales varían entre el 10% y el 40%, tanto en la población general como en el ambiente hospitalario. El hecho de ser portador nasal eleva el riesgo de infección en ciertas poblaciones, como en el caso de pacientes con forunculosis recurrentes y pacientes sometidos a procedimientos médicos, como hemodiálisis o diálisis peritoneal prolongada o cirugía. El estado de portador nasal de *S. aureus* constituye también un medio de persistencia y diseminación de estafilococos multirresistentes, en especial *S. aureus* resistente a la meticilina (*SARM*).

Los individuos proclives a las infecciones estafilocócicas son los recién nacidos, las mujeres en periodo de lactancia, los enfermos crónicos, aquellas personas con afecciones cutáneas e incisiones quirúrgicas y aquellas cuyos sistemas inmunológicos están deprimidos por el uso de corticosteroides, radioterapia, fármacos inmunosupresores o medicamentos anticancerosos.

La heterogeneidad de las enfermedades que es capaz de producir y la capacidad única de *Staphylococcus aureus* para desarrollar resistencias a casi cualquier nuevo antibiótico reflejan la extraordinaria capacidad de este microorganismo para adaptarse y sobrevivir en una gran diversidad de entornos. El *S. aureus* contiene numerosos fragmentos móviles de ADN exógeno, como secuencias de inserción, transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad que contienen determinantes específicos responsables de la enfermedad y de la resistencia antibiótica (Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002).

El *Staphylococcus aureus* ha constituido siempre un obstáculo para la terapia antimicrobiana, y ha superado todos los agentes terapéuticos que se han desarrollado en los últimos 50 años. En 1928 Fleming descubrió las Penicilinas cuyo mecanismo de acción antibacteriano se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias. A finales de 1940 se empezó a comercializar la penicilina en Estados Unidos lo que sin duda marcó el comienzo de la era antibiótica moderna.

3.

Resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antibióticos

3.1. Generalidades.

Los antibióticos son fármacos empleados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias. La diana farmacológica no se localiza en un determinado tejido del organismo infectado, sino en la bacteria. Por tanto, la molécula del antibiótico a utilizar debe ser tóxica para la bacteria a la vez que lo menos tóxica posible para el ser humano.

Los antibióticos pueden ejercer su acción de dos maneras: bacteriostática, es decir, inhibiendo temporalmente el crecimiento de la bacteria, o bactericida, es decir, destruyendo la viabilidad celular. Los mecanismos de acción son los siguientes:

- *Inhibición de la síntesis de la pared celular.* En este grupo se encuentran los β -lactámicos y glicopéptidos que actúan inhibiendo distintos procesos implicados en la síntesis del peptidoglicano.
- *Inhibición de la síntesis proteica,* actuando a diferentes niveles en las subunidades ribosomales 30S y 50S. En este grupo se encuentran los aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cetólidos, cloranfenicol, ácido fusídico y mupirocina.
- *Bloqueo de la síntesis de los Ácidos Nucleicos.* En este grupo se encuentran las sulfonamidas y la trimetoprima, que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico, las quinolonas, que interfieren en la síntesis de la replicación del ADN por inhibición del ADN-girasa, y la rifampicina, que actúa inhibiendo la ARN-polimerasa dependiente del ADN afectando así a la transcripción.

3.2. Resistencia a glicopéptidos.

La resistencia múltiple y el incremento de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina ha provocado un aumento del consumo de glicopéptidos, lo que ha derivado en la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a la vancomicina.

En 1997 fue comunicado por primera vez en Japón, un caso de fracaso terapéutico con vancomicina en un paciente infectado por una cepa de SARM (Hiramatsu et al., 1997). A partir de entonces se han comunicados casos similares, teniendo todos ellos en común el haber recibido un tratamiento prolongado y no efectivo con vancomicina, en el transcurso del cual se aislaron cepas de SARM con sensibilidad disminuida a glicopéptidos. Estas cepas se conocen con el nombre de VISA (vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*) o GISA (glycopeptide intermediate-resistant *S. aureus*).

Se han comunicado dos tipos de resistencia a los gluco péptidos en *Staphylococcus* aislados en la clínica:

1. Resistencia de bajo nivel: (CMI de vancomicina 4 a 8 mg/L). Este tipo de resistencia afecta tanto al *Staphylococcus aureus* como a los *Staphylococcus coagulasa* negativos.

- Sensibilidad disminuida a los glicopéptidos.
- Resistencia heterogénea.
- Engrosamiento de la pared.
- Subpoblaciones de lento crecimiento.

2. Resistencia de alto nivel: (CMI de vancomicina >16 mg/L). Este tipo de resistencia afecta al *Staphylococcus aureus*.

- Producción de gen *vanA* (ligasa *Van A*, D-alanil-D-lactato con baja afinidad por glicopéptidos).
- Fenotipo *vanA*.

El gen *vanA* es un gen que confiere resistencia de alto nivel del SARM a la Vancomicina y Teicoplanina. Este gen apareció por primera vez en Michigan en el año 2002 y es un gen de adquisición externa a partir de *Enterococcus* con fenotipos muy raros que hasta el momento no tenemos en España (Tenover y Pearson, 2004).

3.3. Mecanismos de resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas.

Los Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas (MLS) actúan en la subunidad 50S del

ribosoma bacteriano, bloqueando la síntesis de proteínas. Los mecanismos de resistencia pueden ser:

1. Modificación de la diana bacteriana del fármaco por acción de una metilasa codificada por genes *erm*.
2. Expulsión activa del antimicrobiano.
3. Inactivación del propio fármaco.
4. Modificación de la diana por mutación del ARNr o de proteínas ribosomales.

De estos 4 mecanismos, el más frecuente es el codificado por los genes *erm*, cuyo origen se encuentra en los transposones.

3.4. Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas.

Se han descrito varios mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas en *Staphylococcus aureus* que son:

1. Mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican la producción de la topoisomerasa II.
2. Mutaciones en los genes *parC* y *parE* que codifican la producción de la topoisomerasa IV.
3. Mutaciones en el gen *norA* responsable de una bomba de expulsión activa.

3.5. Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos.

En *Staphylococcus aureus* se han descrito básicamente tres mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos:

1. Mutaciones puntuales en la diana ribosómica.
2. Alteración de la permeabilidad de la membrana.
3. Modificación enzimática del antibiótico por acetilación, fosforilación o nucleotidilación de grupos amino e hidrófilo, siendo este último el mecanismo de resistencia con mayores implicaciones clínicas.

3.6. Mecanismos de resistencia a oxazolidinona

Actualmente, la oxazolidinona es utilizada en la práctica clínica (Linezolid) y aunque la resistencia es poco frecuente, se han descrito *Staphylococcus aureus* con resistencia a este antibiótico (Cuevas et al., 2008). Esta resistencia se debe a la mutación *G2576U* en el gen que codifica la subunidad 23S del ARNr (Pillai et al., 2002).

Recientemente se ha descrito la existencia de otro mecanismo de resistencia mediado por la adquisición de la ARNr (A2503) metilasa, codificada por el gen *cfm* de localización plasmídica (Arias et al., 2008).

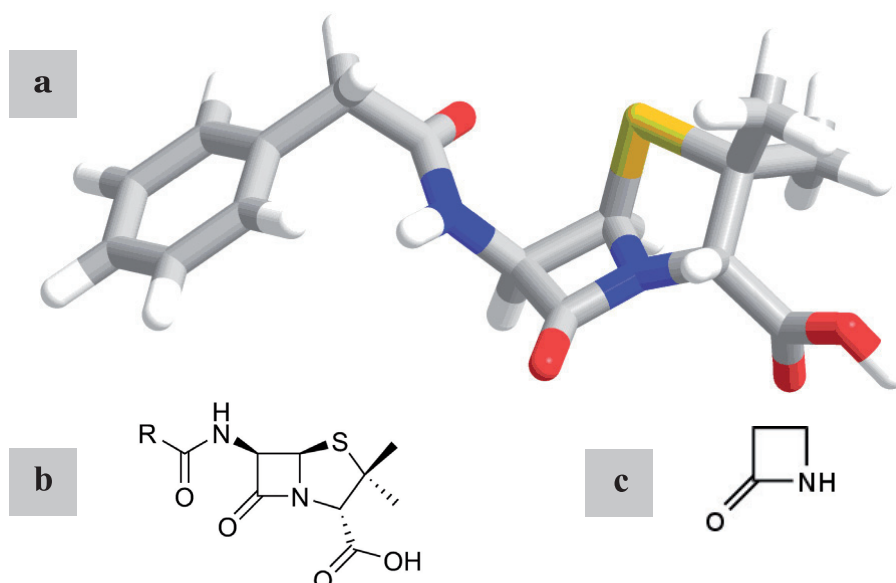
3.7. Resistencia a β -lactámicos.

Poco después de que la penicilina estuviera disponible para su uso comercial se publicó el aislamiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la misma debido a la producción de una β -lactamasa o penicilinasa. Aunque inicialmente su aparición fue esporádica, este tipo de resistencia se extendió rápidamente, siendo frenada temporalmente, por la aparición de la meticilina, ya que en 1961, el mismo año de su introducción como agente terapéutico, se informó la aparición de una cepa resistente a la misma (Barber, 1961). A partir de ese momento, estas cepas han ido extendiéndose progresivamente y constituyen en la actualidad un problema a nivel mundial.

Los β -lactámicos y la penicilina actúan uniéndose a un grupo de enzimas bacterianas denominadas "*penicillin binding proteins*" o *PBPs*. Estas proteínas son responsables de la transpeptidación, transglucosilación y carboxipeptidación, que son funciones importantes para la síntesis del peptidoglicano. Al inhibir la síntesis de este componente principal de la pared bacteriana, ésta se desestabiliza y se produce la lisis y muerte bacteriana.

Las β -lactamasas son enzimas que producen la hidrólisis del anillo β -lactámico (figura 1.3), causando la ausencia de actividad antimicrobiana. Los agentes antimicrobianos β -lactámicos inducen la producción de β -lactamasas en la mayoría de los estafilococos y en concreto las del *Staphylococcus aureus* hidrolizan gran variedad de compuestos β -lactámicos entre los que se incluyen las aminopenicilinas, carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas.

Figura 1.3- (a,b) Molécula y estructura química de penicilina. (c) Anillo β -lactámico.



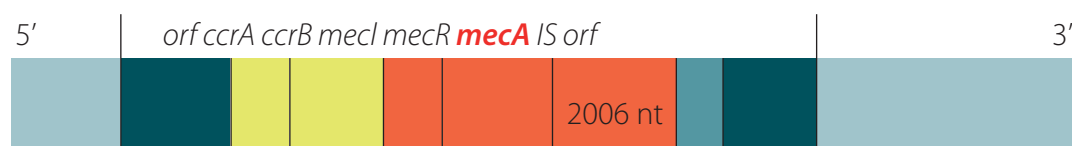
3.8. Meticilina.

La resistencia a los antibióticos inhibidores de las β -lactamasas como la meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina y oxacilina, se ha denominado **resistencia intrínseca** o **resistencia a la meticilina**. Los estafilococos resistentes a la meticilina son productores de sólo una *PBP* dentro de las cuatro existentes, la *PBP2'* o *PBP2a*, la cual presenta baja afinidad por los β -lactámicos. Esta *PBP2a* es codificada por un elemento genético, el gen *mecA* (de aproximadamente 2kb), y este a su vez se encuentra formando parte del *cassette cromosómico estafilocócico* o *SCCmec* que le confiere resistencia a la meticilina.

Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec)

El *SCCmec* es un fragmento de ADN exógeno de 21–67 kb que no se encuentra en estafilococos sensibles a la meticilina, que se integra en el cromosoma del *SARM* en un único lugar (*attBsc*) situado cerca del origen de la replicación del *S. aureus*. El *attBsc* se encuentra en un marco de lectura abierta (ORF, Open Reading Frame), de función desconocida, designado *orfX*, que está bien conservado entre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. (figura. 1.4).

Fig. 1.4– Cassette Cromosómico estafilocócico y gen *mecA*.



Aquellos *Staphylococcus* portadores del gen *mecA* y que expresan la proteína *PBP2a* se consideran resistentes, no sólo a la meticilina, sino también a prácticamente la totalidad de los antibióticos β -lactámicos (Hiramatsu et al., 2001).

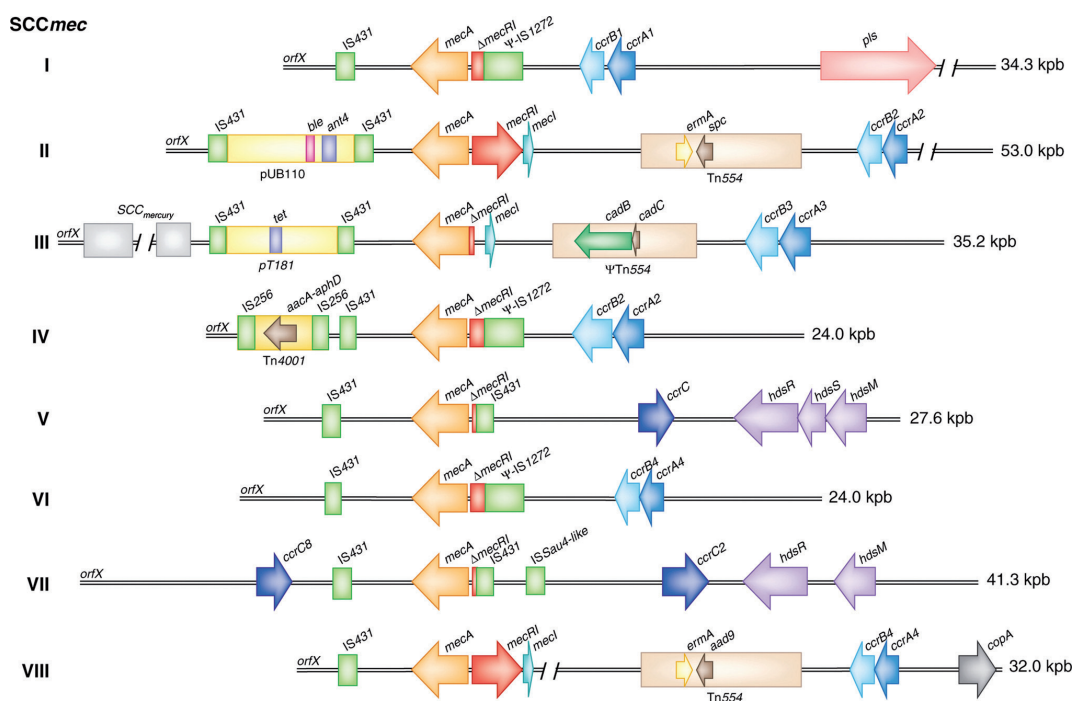
La rápida identificación y tipificación de cepas de *SARM* es una cuestión importante en la descripción de la epidemiología molecular y la evolución del *SARM*, ofreciendo muchas ventajas para el control de la transmisión, tanto en la atención sanitaria como en la comunidad. La descripción del *SCCmec* se considera una técnica esencial junto con la tipificación de secuencias multilocus o MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), descripción del *spa*, y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Deurenberg y Stobberingh, 2008; Faria et al., 2008).

Se han descrito 8 tipos de *SCCmec* I, II, III, IV (IVa, IVb, IVc, IVd), V, VI, VII y VIII que se clasifican en largos o cortos dependiendo de su tamaño (figura 1.5) Los *SCCmec* I, II, III, VI, VIII, que son los cassettes más largos, se han asociado desde hace muchos años a cepas hospitalarias (Ito et al., 2001), sin embargo el *SARM* comunitario presenta normalmente los cassettes IV, V, VII (Malachowa y DeLeo, 2010). Posteriormente, se propusieron dos candidatos diferentes para el *SCCmec* IV: el HDE288 (Oliveira et al., 2001) y CA05, 8/6–3–P

(Ma et al., 2002), el primero de ellos ha sido reclasificado como el tipo de *SCCmec* VI (Oliveira et al., 2006). Más adelante se describe una cepa (WIS), con el elemento *ccr* (CCRC) y la clase *mec* (C2), este tipo fue nombrado como *SCCmec* V (Ito et al., 2004). Más recientemente, ha aparecido en la literatura el tipo *SCCmec* VII (Berglund et al., 2008; Higuchi et al., 2008), sin embargo, el Grupo de Trabajo Internacional para la Clasificación de los elementos del cassette cromosómico estafilocócico (IWG-SCC)) ha determinado que la combinación *ccrC* y *mec* class C1 (Berglund et al., 2008) debe ser reconocido como el prototipo oficial. Por último, el *SCCmec* tipo VIII descrito recientemente se considera una cepa epidémica de Canadá (Zhang et al., 2009).

Recientemente en un análisis molecular en 26 países de Europa se pudo apreciar el dominio en España del *SCCmec* IV que también fue encontrado en el sur de Francia, mientras que el cassette cromosómico *SCCmec* V se asocia a clones presentes en los cerdos. (Vindel et al., 2009; Grundmann et al., 2010).

Fig. 1.5– Comparación de los distintos tipos de *SCCmec*.



Dada la importancia de la rápida identificación y tipificación de los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (*SARM*), para entender la epidemiología molecular y la evolución del *SARM* se han desarrollado marcadores moleculares como PCR Multiplex en tiempo real para la detección del cassette cromosómico (*SCCmec*) del *SARM*. El diseño de este sistema se basa en la definición establecida de tipos de *SCCmec*, es decir, la combinación del complejo *mec* clase con el alotipo *ccr*. También en Estados Unidos y Taiwán utilizaron en un estudio reciente este método de detección rápida de BD-GeneOhm™ de *SARM*, obteniendo una alta tasa de detección entre los aislamientos de *SARM* que albergan

tipos de *SCCmec* comunes y no comunes de los EE.UU. y Taiwán. Los tipos de *SCCmec* aislados fueron I, II, III, IV, V, V (5C2 y 5), VI, VIII. También se pudo encontrar el genotipo ST8 con *SCCmec* tipo IV asociados con clones comunitarios (Boyle–Vavra y Daum, 2010).

Como ya hemos mencionado anteriormente, la resistencia a la meticilina se debe a la existencia de unas proteínas de unión a la penicilina (PBP2a o PBP2') que están codificadas por el gen *mecA*. Estas proteínas tienen actividad transpeptidasa y muy baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos.

En la siguiente tabla (tabla 1.1) se muestran los diferentes mecanismos de resistencia por los que el *Staphylococcus aureus* adquiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos, Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas, Glucopéptidos, Macrólidos y lincosamidas.

Tabla 1.1– Mecanismos de resistencia antibiótica del *S. aureus*.

ANTIBIÓTICO	DIANA CELULAR	GENES DE RESISTENCIA	MECANISMO
β -lactámicos	β -lactamasas PBP2a	Bla-Z <i>mecA</i>	Hidrólisis enzimática del núcleo β -lactámico. Baja afinidad para PBPs.
Aminoglucósidos	RNAr 30S	<i>aacA-aphD</i> , <i>aadA</i> , <i>aadD</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i>	Modificación por acetil-transferasas, adenil-transferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas.
Fluoroquinolonas	DNA girasa	<i>gyrA</i> / <i>gyrB</i> , <i>norA</i> , <i>grlA</i> (o <i>parC</i>)	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, bombas de expulsión, mutaciones en el gen de la DNA topoisomerasa IV.
Glicopéptidos	Complejos D-Ala-D-Ala	Desconocido, Van A	Secuestro por la pared celular.
Macrólidos, lincosamidas	RNAr 50S	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	Metilación del RNAr. Bombas de expulsión.

4. Procesos infecciosos relacionados con *SARM*

La importancia de este microorganismo en la epidemiología y la clínica es extraordinaria. En los hospitales puede presentarse de forma epidémica y endémica, por lo que debe tenerse en cuenta como uno de los agentes etiológicos más importantes en las infecciones nosocomiales. Por otro lado, este microorganismo es con frecuencia multirresistente, obteniendo en muchas ocasiones un fracaso de los tratamientos empíricos y dificultando el manejo de las infecciones.

El impacto de la resistencia sobre la mortalidad del *SARM* es un hecho probado aunque es difícil asegurar que el conjunto de otros factores de riesgo de mortalidad en los enfermos no influyan en la misma, sin atribuirlo en la totalidad a la resistencia.

En los servicios de cuidados intensivos la mortalidad bruta en enfermos infectados puede llegar a alcanzar cifras de entre un 30% a un 50% de casos. La morbilidad de las infecciones por *SARM* podría ser superior a la de *Staphylococcus aureus* sensible (*SASM*) y la duración de la estancia atribuible a estas infecciones es mayor. Esto puede deberse a la dificultad en su tratamiento, así como a las patologías asociadas que padecen los enfermos afectados (Pujol et al., 1994; Rodríguez-Baño et al., 2009).

4.1. Patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*.

Las mucosas y la piel suponen una defensa de barrera mecánica frente a una invasión local de los tejidos. Si por un traumatismo, enfermedad mucocutánea o por una intervención quirúrgica se rompe esta barrera, el microorganismo puede llegar a los tejidos subyacen-

tes y formarse un absceso (tejido necrótico, fibrina y gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos). Asimismo, se puede producir una liberación de toxinas en la piel y otros órganos causando exantema cutáneo y síntomas generales. El *Staphylococcus aureus* es capaz de multiplicarse y desbordar los mecanismos locales de defensa y, en ocasiones, alcanzar el sistema linfático o torrente sanguíneo, ocasionando una bacteriemia estafilocócica, que puede complicarse con metástasis sépticas y/o con el desarrollo de un síndrome inflamatorio sistémico con shock y fallo multiorgánico (Mandell, 2006).

La patogenia de las infecciones invasoras incluye la colonización, la invasión epitelial o de la mucosa, la neutralización de las defensas del huésped, la destrucción tisular y la respuesta inflamatoria local o generalizada. En las intoxicaciones alimentarias, la fase inicial es la ingestión de una cepa toxigénica, seguida por la producción de la toxina, su absorción y la aparición de la enfermedad. Los principales factores de virulencia de este microorganismo se basan en los componentes de su pared bacteriana, en la gran cantidad de enzimas y toxinas que produce y su capacidad, en determinadas circunstancias, de supervivencia intracelular (Lowy FD, 1998).

4.2. Componentes de la pared celular.

El componente fundamental de la pared del *Staphylococcus aureus* es el peptidoglicano, el cual supone el 50% del peso de la pared celular, siendo responsable de la forma y estabilidad del microorganismo. Además, presenta actividad endotóxica, desencadena la producción de interleucina-1, estimula la quimiotaxis y agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes. Otros componentes importantes de la pared celular son los ácidos teicoicos (40% del peso de la misma), polímeros de fosfato específicos de especie, que median en la unión de los estafilococos a las superficies mucosas y tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos. Además, la capa externa de peptidoglicano incorpora, mediante unión covalente, distintas proteínas. Muchas cepas de *Staphylococcus aureus* están recubiertas por una cápsula externa de naturaleza polisacárida, que protege a la bacteria de la fagocitosis por parte de los leucocitos, y aumenta su capacidad de adherencia.

4.3. Enzimas.

Entre las sustancias con actividad enzimática que sintetiza *Staphylococcus aureus* destacan las siguientes:

- *Catalasa*: desdobra el peróxido de hidrógeno, que es un componente muy tóxico, en otros menos tóxicos como son el agua y oxígeno.
- *Coagulasa ligada y libre*: convierten el fibrinógeno en fibrina, por lo que pueden inducir la formación de una capa de fibrina alrededor del microorganismo.

- *Hialuronidasa*: hidroliza el ácido hialurónico, que forma parte del tejido conectivo.
- *Penicilasa*: inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo β -lactámico.

4.4. Toxinas.

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* producen proteínas extracelulares adicionales: toxina α , β , δ y gamma (capacidad hemolítica), Leucocidina de Pantón-Valantine (PVL) (induce la degranulación de los leucocitos polimorfonucleares y la liberación de mediadores de la inflamación), toxinas exfoliativas (actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis y pueden producir el síndrome de la piel escaldada); enterotoxinas (son eméticas y causan toxiinfección alimentaria); toxina del shock tóxico o TSST-1 (induce la liberación de citosinas por macrófagos y linfocitos T, produce la extravasación de las células endoteliales y pueden tener efecto citotóxico).

4.5. Infecciones más frecuentes.

La prevención de infecciones estafilocócicas es problemática dado que muchos individuos son portadores asintomáticos y algunas enfermedades como la foliculitis se pueden contraer por simple contacto cutáneo. En algunas actividades como el cuidado de niños, ancianos, pacientes hospitalizados, así como la manipulación de alimentos, las personas portadoras deben ser excluidas o tratadas con antimicrobianos para eliminar su estado de portador.

En los hospitales es un microorganismo que es causa de numerosos e importantes brotes ya que es difícil eliminarlo y muy fácil transmitirlo (por contacto persona-persona, uso de catéteres y el estado de los pacientes que lo habitan), facilitando la aparición y dispersión de las denominadas cepas hospitalarias (*HA-SARM*).

Un porcentaje determinado de pacientes colonizados por *SARM* desarrolla una infección por este microorganismo, frecuentemente relacionado con algún procedimiento invasivo o con factores de riesgo específicos (Ellis et al., 2004; Nguyen et al., 2005). Las zonas preferentes de colonización por *SARM* son la mucosa nasal, piel, faringe y tracto gastrointestinal, pero el lugar de colonización no es un buen predictor de la infección, ya que no suele coincidir el lugar de colonización con el de infección.

A continuación se describen las infecciones más significativas causadas por *SARM*:

4.5.1. Bacteriemia.

La incidencia de bacteriemias por *SARM* con respecto al total de *Staphylococcus aureus* (EARSS, 2007) alcanza cifras de hasta un 50% en los países del sur del con-

tinente como España, incluyendo Gran Bretaña e Irlanda, en contraste con algunos países como Holanda, donde no llegan al 1% debido a políticas extremas de control. En nuestro país la densidad de incidencia de bacteriemias en el año 2008 fue de 7.2 x 100.000 pacientes/días (EARSS, 2008).

La mayoría de los casos de bacteriemia por *SARM* se producen en pacientes hospitalizados y su aparición suele asociarse al uso de dispositivos intravasculares, aunque también a infecciones del tracto respiratorio e infecciones de piel y partes blandas (Hope et al., 2008).

La mortalidad asociada a la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* es elevada, en torno al 30% a los 30 días de diagnóstico, debido al aumento de la bacteriemia por *SARM* y a la mayor mortalidad asociada a bacteriemia por *SARM* con respecto a la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina (*SASM*) (34% y 27% respectivamente), aunque las causas que justifican este aumento de la mortalidad aún no están claras (Wyllie et al., 2006; Cosgrove et al., 2003).

También la estancia hospitalaria después de la infección en los pacientes con bacteriemia por *SARM* y *SASM* se incrementa significativamente, así como el coste de la resolución de estas infecciones es mucho mayor en los pacientes con *SARM* que la que se atribuye a las bacteriemias por *SASM* (Cosgrove et al., 2005).

4.5.2. Infección Respiratoria.

La neumonía es la segunda infección nosocomial más frecuente y el *Staphylococcus aureus* se halla entre sus tres primeras etiologías. Los episodios causados por *SARM* se asocian sobre todo con la ventilación mecánica prolongada, aunque los pacientes con otros factores predisponentes tales como Enfermedad Obstructiva Crónica (EPOC) o el uso de corticoides pueden también desarrollar neumonía precoz por *SARM*.

4.5.3. Infección de Piel y Partes blandas.

Dado que *Staphylococcus aureus* es un colonizador habitual de la piel, constituye la causa y la probabilidad más frecuentes de que el agente causal de una infección cutánea sea el *SARM*. A los factores de riesgo generales para la infección por *SARM* hay que añadir algunos específicos para las infecciones cutáneas y de tejidos blandos, como pueden ser heridas, traumatismos, quemaduras o distintas dermatosis.

Las infecciones pueden estar limitadas a las capas más superficiales de la dermis o bien afectar a las más profundas.

- Infecciones superficiales. Aquellas que incluyen foliculitis, forúnculos, eczemas e impétigos.
- Infecciones profundas. De tipo ulceroso, incluyendo abscesos, celulitis, linfagitis con linfadenitis, mastitis, fascitis necrosante y piomitis.

Otros factores que las predisponen son la diabetes mellitus, inmunosupresión y vasculopatías entre otros.

4.5.4. Infecciones Osteoarticulares.

Las infecciones osteoarticulares constituyen un amplio y heterogéneo campo de entidades, aunque la mortalidad asociada a estas infecciones no es elevada si lo son las secuelas y alteraciones funcionales asociadas. En el caso de la *artritis séptica* es el *Staphylococcus aureus* el responsable del 37–56% de los aislamientos tanto en adultos como en niños. En la *Osteomielitis*, el agente causal más frecuente es el SARM y está en relación directa con la adquisición nosocomial, la cirugía previa y la epidemiología del centro en cuestión. Por último, las infecciones de prótesis articulares causadas por SARM suelen presentarse como una infección temprana cuyo síntoma principal es el dolor y desarrollo, con frecuencia, de una fístula, o bien de manera tardía en relación con una infección bacteriémica.

4.5.5. Infección de Sitio Quirúrgico.

La infección de sitio quirúrgico (ISQ) anteriormente denominada infección de herida quirúrgica es la tercera infección nosocomial más frecuente (14–16%) y representa el 38% de las infecciones en el paciente quirúrgico. El *Staphylococcus aureus* sigue siendo la causa más frecuente de ISQ aunque están aumentando los microorganismos multirresistentes, y entre ellos el SARM, posiblemente como reflejo de la mayor gravedad o inmunodeficiencia de los enfermos quirúrgicos o del uso indiscriminado de antibióticos.

La presencia de SARM y *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina (SASM) en la herida quirúrgica incrementa 12 y 3 veces respectivamente la tasa de mortalidad en los 90 días posteriores a la cirugía. También la estancia hospitalaria después de la infección y el coste de la resolución de estas infecciones es mucho mayor en los pacientes con SARM que la que se atribuye a la ISQ por SASM (Engemann et al., 2003). La presencia de cuerpos extraños (prótesis y puntos de sutura) aumentan el riesgo de ISQ.

4.5.6. Infección del tracto urinario (ITU).

La bacteriuria por *Staphylococcus aureus*, se produce a través de diversos mecanismos, principalmente por propagación ascendente después de la instrumentación (por ejemplo, sondaje vesical) o siembra hematógica en el tracto genitourinario. La bacteriuria se asocia fuertemente con bacteriemia en pacientes infectados con *Staphylococcus aureus*, por lo que se dice que la bacteriemia es un importante precursor para la bacteriuria. Las tasas de mortalidad hospitalaria son mayores en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* con bacteriuria si se comparan con los pacientes sin bacteriuria (39% vs 17%, respectivamente). Se consideran como predictores significativos de mortalidad un urocultivo positivo y ser portador de sonda vesical permanente (Chihara et al., 2010).

5. Epidemiología del *SARM*

5.1. Historia y Evolución del *SARM*.

Como ya hemos mencionado con anterioridad, la historia del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se remonta a 1961, cuando se aisló por primera vez en un hospital del Reino Unido (Barber, 1961). A partir de ese momento, el *SARM* comenzó a extenderse a hospitales de todo el mundo, hasta que a finales de la década de los 80 y durante la década de los 90 su prevalencia se hizo manifiesta en gran cantidad de países (Johnson et al., 2001; Styers et al., 2006).

A comienzos de este siglo, se demostró que la mayoría de las hasta entonces denominadas cepas hospitalarias, por ejemplo el ***SARM* de origen hospitalario (HA-SARM** o *Hospital Acquired MRSA*) pertenecían a sólo 5 complejos clonales (CC o Clonal Complex) que eran: CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45 (Enright et al., 2002) y que generalmente poseían uno de los *SCCmec* de mayor tamaño (tipos I y III) (Robinson y Enright, 2003), explicando en parte su resistencia a la mayor parte de los agentes antimicrobianos empleados en la clínica (Tenover et al., 2001).

Es asumido que en los humanos, el uso inadecuado de los agentes antimicrobianos puede llevar a la selección y emergencia de microorganismos resistentes a estos antibióticos, por lo que el uso de un tratamiento prolongado de antimicrobianos se considera un factor de riesgo para la adquisición de *SARM* de origen hospitalario, así como una hospitalización prolongada, ingreso en una unidad de cuidados intensivos, procedimientos quirúrgicos o proximidad a un paciente hospitalario que está colonizado con *SARM* (Thompson et al., 1982; Boyce, 1989).

Una segunda fase en la historia del *SARM* surgió a mediados de los 90 cuando comenzaron a comunicarse infecciones en pacientes no hospitalizados de cepas de *SARM* distintas a la cepa hospitalaria (Herold et al., 1998; Chambers, 2001). En este momento surge la denominada **cepa comunitaria (CO-SARM** o *Community Acquired MRSA*) y en la actualidad se encuentra distribuida a nivel mundial. A pesar de que ha habido cierta discrepancia sobre el origen de algunos casos, los análisis genéticos han demostrado una clara diferencia con el *HA-SARM*, ya que predominan los pertenecientes al ST1, ST8, ST30, ST59, ST80 y ST93 (Vandenesch et al., 2003) y la gran mayoría posee *SCCmec* de menor tamaño (tipos IV y V), explicando su mayor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Por otro lado, el CO-SARM es portador del gen que codifica para la toxina Pantón-Valentine Leucocidina (PVL).

Los factores de riesgo para su adquisición son diferentes en comparación con el *HA-SARM*, donde la mayoría de los casos se han relacionado con el uso de drogas intravenosas, homosexualidad, deportes de contacto, niños y personal militar y carcelario (Pathak et al., 2010; Fontanilla et al., 2010; Maree et al., 2010; Ellis et al., 2009; David et al., 2008; Sztramko et al., 2007).

A pesar de que el *SARM* se aisló por primera vez en 1972 en vacas con mastitis en Bélgica (Devriese et al., 1972), los animales no parecen tener un papel importante durante la historia del *SARM*. Basándose en los resultados de tipaje disponible en aquel momento, se concluyó que esos primeros aislamientos tenían un origen humano (Devriese y Hommez, 1975). Posteriormente, en otros aislamientos de *SARM* aislados en animales (principalmente animales de compañía) las cepas presentaban genotipos humanos. Este hecho no resultó sorprendente, debido al incremento de la prevalencia de *SARM* en miembros de la comunidad que no estaban hospitalizados en ese momento. El problema con los *SARM* y los animales de compañía creció desde entonces y en 2005 causó cierta preocupación cuando en Holanda se vio la posible asociación entre el *SARM* y la ganadería porcina (Voss et al., 2005).

Esta tercera fase en la historia del *SARM* surgió de manera accidental mediante un inesperado aislamiento de *SARM* en una familia de granjeros de cerdos y en uno de sus cerdos (Voss et al., 2005). Los resultados de las investigaciones posteriores mostraron que granjeros de una misma zona geográfica eran portadores de *SARM* en un orden 760 veces superior al de la población holandesa general. Los estudios de PFGE mostraron que todas las cepas eran resistentes al corte de la enzima *SmaI*, mientras que otras técnicas moleculares como el *spa-typing* o el estudio de polimorfismos demostraron la estrecha relación entre todas las cepas aisladas.

Unos meses más tarde un granjero de cerdos, un veterinario que trabajaba mayoritariamente con cerdos, el hijo de dicho veterinario y la enfermera que lo trataba resultaron colonizados por una cepa de *SARM*, llegando a la conclusión de que el trabajo

con cerdos era un factor de riesgo para la colonización de *SARM* en humanos (Voss et al., 2005).

Por aquel entonces, la importancia de este tipo específico de *SARM* no estaba clara, además, el hecho de que pudiera extenderse el problema a otros animales era sólo una especulación. Sin embargo, con el paso del tiempo comenzaron a aparecer comunicaciones a cerca de este tipo de *SARM* no sólo en cerdos, sino también en otro tipo de animales como ganado, caballos o perros entre otros y personas relacionadas con la ganadería (Nemati et al., 2008; de Neeling et al., 2007; Sergio et al., 2007; van Loo et al., 2007a; Witte et al., 2007; Khanna et al., 2008; Wulf et al., 2008a; Denis et al., 2009) y que además era capaz de causar enfermedad en los animales (Vanderhaeghen et al., 2010; Sergio et al., 2007; Witte et al., 2007) al igual que en el hombre (van et al., 2007; Witte et al., 2007; Huijsdens et al., 2006; Lewis et al., 2008; Wulf et al., 2008a).

Podemos decir que este *SARM* posee ciertas características:

- No es tipificable mediante el protocolo estándar de electroforesis en gel de campos pulsantes empleando la enzima *SmaI* debido a la metilación de la diana para dicha enzima (Bens et al., 2006).
- Se corresponde mayoritariamente con el MLST ST398 y por tanto todas ellas pertenecen al Complejo Clonal 398 (van Loo et al., 2007a).
- Presenta diversos *spa*-types.
- Son portadoras de *SCCmec* tipo IVa y V, aunque algunos estudios han encontrado el tipo III (Nemati et al., 2008; van Loo et al., 2007a; Wulf et al., 2008 c).
- Generalmente carecen de PVL que si suele estar presente en el *HA-SARM* y *CO-SARM* (Walther et al., 2009).
- Resistencia a tetraciclina y frecuentemente a los macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos, fluoroquinolona y trimetropima (Nemati et al., 2008; Vanderhaeghen et al., 2010; Witte et al., 2007; Denis et al., 2009; Lewis et al., 2008).

En un primer momento, debido a su resistencia a la digestión con la enzima de restricción *SmaI* (Voss et al., 2005; de Neeling et al., 2007; van Belkum et al., 2008; Rasschaert et al., 2009), se propuso denominar a estas cepas como ***SARM No Tipificable (NT-SARM*** o *Non Typeable MRSA*). Esta propuesta no tuvo mucho éxito ya que se podían tipificar mediante otros métodos y posteriormente se comenzaron a usar otras enzimas de restricción para las que no era resistente (Rasschaert et al., 2009). La cepa ST398 parece estar ausente en la población humana hasta las primeras comunicaciones de principio de los 2000 y los datos resultantes del tipaje indican que su presencia en el ser humano es reciente y está asociada a su aparición en el ganado y más específicamente en el cerdo (van Loo et al.,

2007a; Armand–Lefevre et al., 2005). Todo esto apoya la hipótesis de un origen asociado al ganado por lo que el término más apropiado para referirse a esta cepa es el de **SARM asociado a ganado** o **LA–SARM** (del inglés *Livestock–Associated MRSA*).

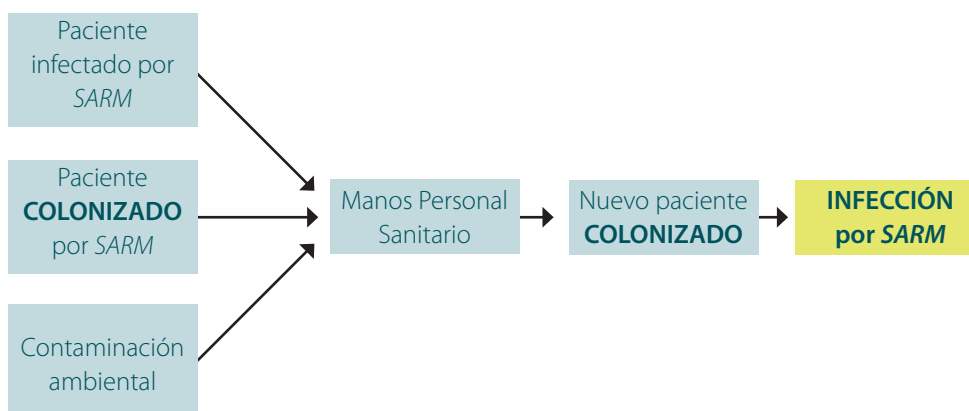
5.2. Reservorios.

El reservorio se refiere al hospedador o huésped de largo plazo de un patógeno que causa una enfermedad infecciosa zoonótica. Frecuentemente, hospedador no es afectado por la enfermedad que lleva el patógeno, o permanece asintomático sin riesgo para su vida. El reservorio del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina es esencialmente humano, si bien en los últimos años se le ha ido identificando en reservorios animales especialmente cerdos y en menor grado otros animales como el caballo y el ganado vacuno.

5.2.1. Reservorio humano.

El principal reservorio del *SARM* es el paciente colonizado o infectado por el microorganismo (Pujol et al., 1996). Esta colonización puede llegar a ser prolongada en el tiempo, incrementándose así la posibilidad de diseminación del microorganismo dentro del mismo hospital y desde el hospital a otros centros. Por cada caso de infección por *SARM* detectado mediante muestras clínicas, seguramente existen dos pacientes que están colonizados (especialmente a nivel de las fosas nasales pero también periné, axilas y vías respiratorias altas) (Wenzel et al., 1998) que son conocidos como **portadores**. Estas personas sólo son detectables mediante los sistemas de vigilancia activa y tienen gran importancia epidemiológica, ya que actúan como reservorios del microorganismo y lo transmiten a otros pacientes (Wenzel et al., 1998; Sopena y Sabrià, 2002). Por tanto, cuando hablamos de reservorio humano nos referimos tanto a pacientes con infecciones por *SARM*, como a un número elevado de pacientes colonizados.

A nivel hospitalario, el personal sanitario debe considerarse como potencialmente contaminante (Dancer, 2008) ya que puede constituir un reservorio y juega un papel importante en la transmisión a otros pacientes por su proximidad a los mismos (figura 1.6). Dado que en la comunidad existen cada vez más portadores sanos, tanto de cepas de origen hospitalario como de origen comunitario, se produce a ese nivel una transmisión extrahospitalaria que se introducirá posteriormente en el hospital mediante el de ingreso de nuevos pacientes. Es por ello que las visitas constituyen igualmente un posible reservorio a través de portadores.

Fig.1.6– Vías de transmisión del *SARM*.

5.2.2. Reservorio ambiental.

El *SARM* se ha aislado de diversos objetos y superficies en las habitaciones de los pacientes colonizados (Oie y Kamiya, 1996), existiendo la posibilidad de que el microorganismo se transmita desde estas superficies a otros pacientes que ingresen posteriormente en la misma habitación o mediante objetos de uso común como puede ser el estetoscopio (Oie y Kamiya, 1996; Sexton et al., 2006). Aunque parece que este tipo de transmisión no es tan importante como la transmisión cruzada entre personas, debe tenerse en cuenta en circunstancias especiales como pueden ser los pacientes con grandes quemaduras.

5.2.3. Reservorio animal.

Entre los años 1970 y 2000, el *SARM* se ha aislado esporádicamente en animales, sobre todo en vacas, caballos y animales de compañía (Faireset al., 2010; Cuny et al., 2010), pero el reservorio principal del *LA-SARM* en los países afectados son los **cerdos**, donde la presencia del microorganismo no tiene relevancia comercial ya que es un microorganismo oportunista y los cerdos están sanos. El problema se presenta cuando este microorganismo es capaz de colonizar al ser humano donde actualmente son una causa importante de infección hospitalaria en muchos países europeos, presentando grandes diferencias en cuanto a la prevalencia y las políticas de control (EFSA, 2009).

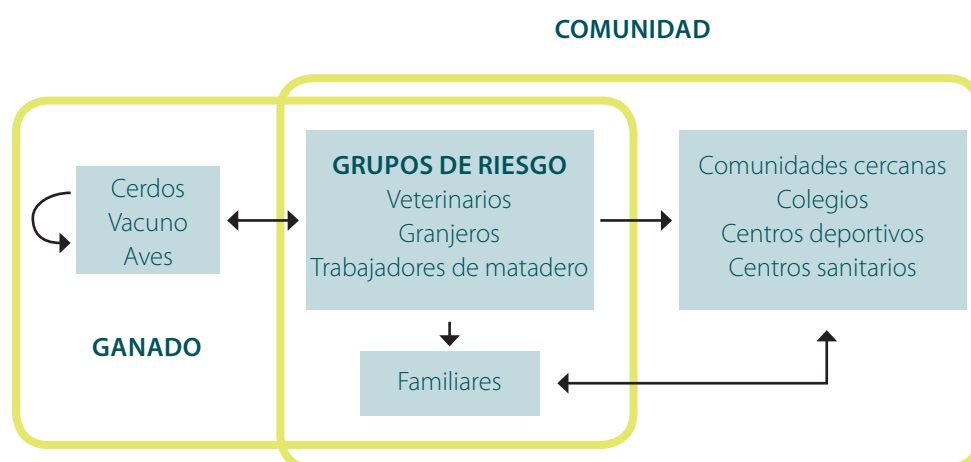
El problema de la aparición de microorganismos resistentes tales como el *LA-SARM* está estrechamente relacionado con un mal empleo de los agentes antimicrobianos en la medicina humana y veterinaria. Las explotaciones porcinas intensivas en las que los animales se encuentran hacinados y estabulados son más numerosas que las explotaciones expansivas, donde el animal se encuentra en libertad. La terapia preventiva o el tratamiento de animales sanos que conviven con otros enfermos pueden suponer un factor de riesgo para la aparición de

estas cepas cuando se emplean subdosis, se prolonga demasiado el tratamiento o no se realiza un diagnóstico apropiado.

Un estudio realizado por van Duijkeren (van Duijkeren et al., 2008) desveló que el número de cerdos colonizados por *Staphylococcus aureus* era más alto en granjas que aplicaban tratamientos orales en sábana, a menudo con tetraciclinas, comparado con aquellas granjas que no lo hacían; sin embargo, otro estudio de Broens (Broens et al., 2010) no encontró tal asociación.

El LA-SARM se ha asociado en ocasiones con una infección profunda de la piel y el tejido blando, neumonía y septicemia en humanos. Cuando la prevalencia de este microorganismo en animales de producción es alta, las personas en contacto con estos animales (especialmente ganaderos y veterinarios, y sus familias) tienen un mayor riesgo de colonización e infección que la población general (figura 1.7).

Figura 1.7– Rutas de transmisión del SARM asociado al cerdo desde animales colonizados al ser humano.



Estudios realizados en distintos países europeos indican que la prevalencia de este patógeno entre los profesionales que desarrollan su actividad en granjas de cerdos oscila entre un 20% y un 40%, normalmente portadores sanos (Voss et al., 2005; Denis et al., 2009).

EL LA-SARM parece ser el SARM predominante en los cerdos, ya que de los muchos estudios realizados, sólo en dos de ellos mencionan la detección de SARM diferentes al asociado al ganado. En Singapur fue aislado un ST22 (Sergio et al., 2007). Este SARM había sido encontrado en la población hospitalaria de Singapur y también se le conoce como UK-EMRSA-15, uno de los mayores clones hospitalarios del Reino Unido, indicando contaminación humana de los cerdos. En Canadá, el 14% de los SARM aislados en cerdos eran pertenecientes al clon humano CMRSA-2, mientras que el 74,4% pertenecían al LA-SARM (Khanna et al., 2008). El porcentaje restante pertenecía a clones poco frecuentes diferentes a los ya mencionados.

La mayoría de las comunicaciones de *LA-SARM* en cerdos proceden de Europa, especialmente de Holanda (Voss et al., 2005; de Neeling et al., 2007; Huijsdens et al., 2006; van Duijkeren et al., 2008), pero también se han encontrado en Bélgica (Denis et al., 2009), Dinamarca (Guardabassi et al., 2007), y Alemania (Cuny et al., 2010; Witte et al., 2007) entre otros países europeos. Asimismo, también hay aislamientos en Canadá (Khanna et al., 2008), Singapur (Sergio et al., 2007) y Estados Unidos (Smith et al., 2009).

Los estudios demuestran que la colonización de cerdos sanos y los porcentajes de prevalencia varían de unos países a otros, desde un 10% en Dinamarca (Guardabassi et al., 2007), 24,6% en Canadá (Khanna et al., 2008) a un 40% en Bélgica y Holanda (de Neeling et al., 2007).

En el caso de los cerdos y otros animales, estos actúan como reservorios con los que entran en contacto las personas que tienen contacto directo con ellos y por consiguiente los familiares de estos, favoreciendo así la dispersión de este microorganismo y constituyendo un serio problema para su control.

5.3. Mecanismo de transmisión.

En la transmisión humana el mecanismo fundamental es el de contacto directo o indirecto mediado por las manos, que evidentemente se realiza mayoritariamente a través del personal sanitario que tiene una relación directa con los pacientes, incluyéndose en este grupo a médicos, enfermeros, auxiliares de enfermería y cualquier otra persona que realice cuidados sanitarios en centros residenciales.

En la comunidad esta transmisión tiene lugar tanto en el ámbito familiar como en el laboral o en cualquier otro ámbito en el que se produzcan contactos repetidos.

El entorno de los pacientes constituye un medio habitualmente contaminado por *Staphylococcus aureus* y más concretamente por *SARM*, dada la capacidad de supervivencia ambiental que tienen estos microorganismo dentro de un amplio rango de temperatura y humedad.

Esta contaminación es especialmente importante en la proximidad del enfermo y en el conjunto del material que se utiliza para el cuidado del mismo (ropa de cama, estetoscopio, fonendoscopio, otoscopios, ordenadores, mesilla auxiliar, teléfono, esfigmomanómetro, y buscapersonas). Los hábitos de un correcto lavado de manos, antes y después del trato a un paciente, evita que estas actúen como un vector potencial de transmisión, evitando la colonización de pacientes y personal (Muto et al., 2003). El grado de contaminación del material inerte, del suelo y del mobiliario disminuye a medida que se aleja del paciente (Dancer, 2008).

El mecanismo de transmisión puede romperse en cualquier momento y aquí juega un papel fundamental la limpieza y desinfección, la higiene de manos y las precauciones estándares no solo para el control de la diseminación del *SARM*, sino también el de otros muchos patógenos del medio hospitalario. La propagación de esta bacteria que se considera como un comensal para el hombre podría perpetuarse por una transmisión dinámica entre el hombre y el medio ambiente.

Cuando se trata de reservorios animales la transmisión se realiza por el contacto directo del personal que trabaja tanto en centros de producción y sacrificio, así como en los del cuidado del animal. Como ya hemos mencionado anteriormente, un estudio realizado por Voss en 2005, ha documentado la aparente transmisión de *SARM* entre cerdos y granjeros y sus familiares, destacando especialmente que los granjeros de cerdos son mucho más propensos a ser colonizados por *SARM* que la población general (Huijsdens et al., 2006; Voss et al., 2005).

5.4. Huésped susceptible.

- Cualquier persona sana o enferma puede colonizarse por *SARM*.

A nivel hospitalario, son especialmente susceptibles de ser colonizados por *HA-SARM* aquellos pacientes con estancias prolongadas o admisiones reiteradas en el hospital; otros factores del huésped tales como edades extremas y enfermedad subyacentes (diabetes, neoplasia y trasplantes) pueden incrementar la sensibilidad a la infección y puede variar con la medicación que altera la flora normal (antibióticos, corticoides, antineoplásicos, inmunosupresores entre otros). La cirugía, la radioterapia y dispositivos extrínsecos tales como sondaje urinario, ventilación mecánica o catéteres vasculares, facilitan el desarrollo de infecciones por que permiten a patógenos potenciales traspasar las barreras defensivas naturales.

Una vez que el paciente se coloniza por *SARM* se convierte en un riesgo elevado para la transmisión a otros pacientes y para él mismo, ya que desde su estado de portador se puede producir una infección en cualquier localización. Se calcula que entre un 10% y 30% de los pacientes colonizados desarrollan una infección que evidentemente va a tener un grave impacto en su evolución e incluso puede ser la causa de su muerte.

En la comunidad se producen cada vez más colonizaciones–infecciones, como lo demuestra el incremento cada vez mayor de lo que denominamos infecciones extra hospitalarias por *SARM* o *SARM* comunitario (*CO-SARM*).

En el caso de aquellas personas que están relacionadas con el ámbito de la veterinaria y/o la ganadería, el contacto con los animales y su entorno son considerados actualmente factores de riesgo, siendo por tanto estas personas y sus familiares susceptibles de ser colonizados por el *LA-SARM*.

6.

Situación actual del *SARM*

Desde su primera aparición, las cepas de *SARM* se han extendido considerablemente. Actualmente, la preocupación es el incremento de este microorganismo en personas que no han tenido contacto con la atención sanitaria (*SARM*-CO) y en aquellas personas que trabajan en contacto con animales de granja, especialmente con el cerdo (*SARM*-LA).

Dada la importancia del tema en salud pública, la *European Food Safety Authority* (EFSA) ha realizado el primer estudio sobre prevalencia de este microorganismo en las explotaciones porcinas europeas.

El muestreo se llevó a cabo entre enero y diciembre de 2008 e incluye 1.421 instalaciones de cría y venta, y 3.176 explotaciones reproductoras que mantenían y comercializaban cerdos de engorde y de sacrificio. En el estudio participaron 24 estados miembros y 2 países no pertenecientes a la UE, en 17 de los cuales (70,8%) se detectó *SARM* en las explotaciones de reproducción o de producción, mientras que en 7 de ellos no detectaron *SARM* en ninguna de las explotaciones investigadas.

El *SARM* ST398 resultó ser la cepa más detectada, aunque algunos países han notificado el aislamiento de otras cepas con una prevalencia mucho menor.

En las instalaciones que mantienen cerdas reproductoras, la prevalencia de *SARM* en los 24 estados miembros participantes fue del 22,8%, donde el *SARM* ST398 ha sido la cepa predominante, contando con el 92,5% de los aislamientos de *SARM*. El análisis de los resultados separados según la orientación de la explotación indica que el *SARM* ha sido detectado más frecuentemente en las explotaciones orientadas a la producción que en las explotaciones orientadas a la reproducción.

En la actualidad es evidente que las personas que tienen contacto frecuente con cerdos y terneros vivos tienen tasas de carga bacteriana extremadamente altas (prevalencia del 25–35%) si las comparamos con personas que no tienen contacto con este tipo de animales (van Cleef et al., 2011).

En hospitales de las áreas de cría densa en los Países Bajos, la mayoría de los recientemente identificados como portadores de *SARM* presentan el clon ST398 (van Rijen et al., 2008), indicando que el *SARM* no sólo es un patógeno humano, sino también un patógeno zoonótico.

Las medidas preventivas para evitar la propagación de este microorganismo deben dirigirse a aquellas personas que trabajan con animales o viven en granjas y la evolución futura del ST398 debe ser cuidadosamente vigilada.

En los hospitales y centros médicos de Estados Unidos durante las últimas décadas la prevalencia de *SARM* ha aumentado constantemente. En la década de 1990, el *SARM* representó entre el 20% y el 25% de los *S. aureus* aislados en pacientes hospitalizados (Boyce, 1995).

El *Nacional Nosocomial Infection Surveillance System*, actualmente denominado *Nacional Healthcare Safety Network* (NHSN), ha demostrado un continuo incremento en la incidencia de infecciones nosocomiales causadas por *SARM* en los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, llegando a representar el 56,8% de los aislamientos de *S. aureus* en las UCI de EEUU y en las UCI de Latinoamérica, Asia, África y Europa representa un 84,1% (Rosenthal et al., 2010).

Aproximadamente 1,7 millones de individuos adquieren la infección por *SARM* en Estados Unidos durante la hospitalización y de ellos aproximadamente 100.000 mueren, todo esto supone un coste de entre 27.083 y 34.000 dólares por paciente, que es de 1,5 a 3 veces mayor que en un paciente con infección por *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. Consecuentemente el coste anual en servicios sanitarios asociado a la infección por *SARM* es de 6,5 billones de dólares (Diekema y Climo, 2008). Por lo tanto la prevención y control en la transmisión del *SARM* constituye un desafío para los profesionales del control de la infección en todo el mundo.

Como en todo el mundo, el *SARM* también es un patógeno altamente prevalente en muchos países de Europa. En Holanda su prevalencia entre aislamientos clínicos es del 1%, encontrándose estas cifras entre una de las más bajas de Europa. Esta baja prevalencia se debe fundamentalmente a su política nacional de “Búsqueda y destrucción” (“*Search and Destroy*”) que implica un estricto screening y aislamiento de todos aquellos pacientes considerados con riesgo de ser portadores de *SARM* en el momento de su admisión hospitalaria.

España no ha sido distinta al resto de Europa. Antes de 1981 no había sido aislado ningún *SARM* y no empezó a ser problemático hasta 1986 cuando se describió un brote epidémico de extraordinarias dimensiones en el Hospital General Gregorio Marañón de Madrid. En ese momento surgieron brotes de *SARM* en otros hospitales de Madrid y Barcelona, así como en el resto de España, implantándose progresivamente una situación de endemia permanente y creciente.

En un estudio de las infecciones por SARM en los periodos comprendidos entre 1993 y 2003 en España, donde participaron 17 regiones, se pudo ver que el 23,8% de las infecciones por *Staphylococcus* en pacientes hospitalizados eran SARM. Los pacientes infectados por SARM tenían una edad mayor que los infectados por SARM ya que la prevalencia de infección por SARM aumenta linealmente con la edad. La proporción de SARM es mayor entre pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos que en los que ingresan en unidades médicas, quirúrgicas, obstétricas o unidades pediátricas representando el 34%, 25%, 22%, 11% y 9% respectivamente (Asensio et al., 2006).

Diversos estudios de prevalencia multicéntricos han mostrado un aumento en el porcentaje de resistencia a meticilina del *Staphylococcus aureus* a lo largo de la década de 1990 hasta alcanzar cifras que según los datos del *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) oscilan entre el 23 y 28% (EARSS, 2008). En los últimos datos del estudio EPINE, se puede observar como en los hospitales españoles, la prevalencia de SARM con respecto a los *Staphylococcus aureus* sensibles se encuentra en un periodo de meseta, representado el SARM en los años 2008 y 2009 el 36,2% y 28,1% respectivamente del total de *Staphylococcus aureus* (EPINE, 2009).

Comparando la prevalencia de resistencia a antibióticos en aislamientos invasivos de *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles podemos decir que en los aislamientos de SARM la resistencia a antibióticos como Ciprofloxacino, Eritromicina y Gentamicina es considerablemente más elevada que en los aislamientos de SARM. En un estudio nacional de resistencia del SARM realizado en el año 2006 en España, el SARM mostró resistencia en 135 de los aislamientos al ciprofloxacino (93,3%), tobramicina (72,6%), gentamicina (20,0%), eritromicina (66,7%) y clindamicina (39,3%). Todos los aislados fueron sensibles a los glucopéptidos (Vindel et al., 2009).

En cualquier caso, la situación en los distintos hospitales es heterogénea. El aumento progresivo en la frecuencia de infecciones por SARM a la que asistimos durante los últimos años del siglo XX podría estar dando paso a una situación de meseta, situación que no es ajena al desarrollo de programas de control en nuestros hospitales y a la sustitución de determinados clones anteriormente predominantes, como es el caso del denominado clon ibérico, por otros.

La situación de nuestro país sería intermedia entre países con elevados porcentajes de resistencia a meticilina (Estados Unidos, Reino Unido) y aquellos con porcentajes inferiores al 5% (Países Bajos, Escandinavia).

En el Hospital Universitario de Canarias (HUC) en el año 1997 se constataron cifras de incidencia de infección por SARM de un 32%, que con la implementación de las medidas de aislamiento de contacto, descolonización nasal con Mupirocina tópica, baños diarios con jabón de povidona yodada en ese momento (en la actualidad jabón de Clorhexidina 4%) y despistaje de SARM en pacientes, se lograron reducir hasta un 14% en los dos años siguientes. Sin

embargo, las tasas volvieron a aumentar notablemente en los años 2000 (33%), 2001 (46%), 2002 (34%), 2003 (40%), 2004 (47%), 2005 (52%) y 2006 (41%) a pesar de seguir manteniendo siempre la misma política de control de la infección.

A pesar de la controversia entre los profesionales del control de la infección durante los últimos años sobre la transmisión del *SARM*, muchos estudios recientes demuestran que la transmisión del *SARM* puede ser controlada por la implementación de medidas preventivas efectivas, no solo en hospitales con una baja prevalencia de *SARM* sino también en aquellos donde el *SARM* es altamente endémico.

Varios factores pueden haber contribuido a este aumento significativo en la prevalencia de *SARM* como por ejemplo: presión selectiva ejercida por la exposición a agentes antimicrobianos, especialmente fluoroquinolonas, fuera de la UCI y / o en la comunidad (Fridkin et al., 2002; Madaras-Kelly et al., 2006), las tasas crecientes en la comunidad de colonización y la infección por *SARM* (Fridkin et al., 2005; Kuehnert et al., 2006), la adhesión a las prácticas inadecuadas de control de infecciones, o una combinación de todos estos factores.

Los impactos económicos de las infecciones asociadas a cuidados sanitarios causada por el *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (*SARM*) son bien conocidos por los medios de comunicación, organizaciones de consumidores y autoridades sanitarias por lo que la vigilancia y notificación del *SARM* en hospitales de algunos países de la Unión Europea y Estados Unidos han sido establecidas por la legislación estatal. Al mismo tiempo, organizaciones nacionales responsables del control de la infección y organismos asesores de salud pública han publicado directrices para promover la aplicación de estos programas de control del *SARM* en los centros sanitarios, recomendando diferentes directrices como: vigilancia activa mediante *screening* y aislamiento de los pacientes, la higiene de manos, concertar el traslado de los pacientes, precauciones de contacto y uso de los métodos de barrera y descolonización así como limpieza ambiental y de superficies.

El valor de estas estrategias está fuertemente apoyado por la experiencia en los Países Bajos y escandinavos, que han sido capaces de proteger sus instituciones de la transmisión del *SARM* y han conseguido disminuir las tasas de bacteriemias después de intensificar los programas nacionales de control. Una piedra angular en el éxito de la aplicación de cualquier estrategia en la atención sanitaria consiste en integrar su objetivo en la cultura y la ética de todos los profesionales que trabajan en estas instituciones (Struelens et al., 2009).

Muchos trabajos en este ámbito han demostrado que hospitales que han implantado programas de vigilancia y control de infecciones han reducidos la tasa de infección nosocomial hasta en un 20%. Estas reducciones aumentan progresivamente cuando la vigilancia ha estado en funcionamiento al menos durante un año.

Alrededor del 25% de los pacientes que se colonizan con *SARM* durante la hospitalización desarrollan infecciones y constituyen un reservorio importante para la transmisión del *SARM* en

la comunidad por lo que se deben poner en marcha estrategias de prevención del *SARM* en los hospitales y estas tienen como objetivo primario la prevención de la transmisión cruzada. Estas estrategias incluyen promoción de las prácticas de higiene de manos, limpieza y desinfección medioambiental, identificación temprana de los pacientes portadores y un manejo adecuado de los pacientes colonizados/infectados por *SARM* bajo aislamiento de contacto.

7. Vigilancia Activa

La vigilancia activa tiene como objetivo fundamental la detección precoz de este importante reservorio de *SARM* formado por aquellos pacientes con colonización asintomática, identificando a aquellos pacientes colonizados y sometiéndolos a aislamiento de contacto para minimizar las infecciones en estos pacientes y controlar la transmisión de los mismos tanto por contacto directo como por contacto indirecto.

Las pruebas acumuladas sugieren que la vigilancia activa para identificar los portadores de *SARM*, utilización de las medidas de aislamiento y la descolonización nasal reducen la tasa de infección de *SARM* en los países donde la prevalencia de esta enfermedad es baja, por lo que se ha definido como rentable la instauración de sistemas de vigilancia activa (Shitrit et al., 2006).

8.

Métodos para la detección del *SARM*

8.1. Medios de cultivos.

Son muchos los métodos habilitados para la detección del *SARM*, basados en el cultivo que ofrecen un alto grado de sensibilidad y especificidad (Nahimana et al., 2006), incluyendo desde los medios selectivos hasta los más recientes como los métodos cromogénicos.

Estos últimos son los más empleados actualmente, ya que además de eliminar los problemas de baja sensibilidad y especificidad, disminuyen considerablemente el tiempo entre la toma de la muestra y obtención de los resultados.

8.2. Métodos moleculares.

8.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Otro de los métodos empleados para la detección rápida de *SARM* es la **Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real** (RT-PCR o *Real Time PCR*) directamente del frotis nasal, la cual proporciona resultados precisos en un tiempo inferior a una hora. Esta técnica se emplea en la Vigilancia Activa (VA) a nivel hospitalario para la identificación de pacientes portadores de este microorganismo permitiendo la rápida implementación de las precauciones de contacto para limitar su transmisión.

8.2.2. Tipificación molecular de microorganismos. Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE).

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas más importantes de los últimos años. Estos sistemas comprenden gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos de manera que se pueda conocer la relación epidemiológica existente entre ambos, pudiendo determinar si proceden de un precursor común o por el contrario no se encuentran relacionados.

Uno de los métodos moleculares aplicados para el estudio epidemiológico es la macrorrestricción del ADN cromosómico mediante la técnica de **Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE o Pulsed Field Gel Electrophoresis)**. Esta técnica es una de las más empleadas ya que presenta gran versatilidad y permite conocer la clonalidad de diferentes aislados en situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido.

9.

Control del consumo de antimicrobianos
y política de antibióticos

Como ocurre con otros microorganismos multirresistentes, el uso de antimicrobianos puede facilitar la adquisición, el mantenimiento del estado de portador del paciente y la transmisión del *SARM*. Algunos estudios han demostrado una relación entre el consumo de antimicrobianos (sobre todo, de cefalosporinas, macrólidos, y de manera particular las fluoroquinolonas) y la incidencia de *SARM* (Muller et al., 2003; Monnet et al., 2004).

La exposición prolongada a antibióticos de amplio espectro como cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas constituyen un factor de riesgo independiente para la colonización e infección por *SARM* según numerosos estudios. Sin embargo, las intervenciones centradas en el consumo de antimicrobianos han demostrado un impacto que, aunque significativo, parece muy limitado (Madaras–Kelly et al., 2006). Por todo ello y aunque el efecto de las políticas de control de antibióticos en la prevención del *SARM* es incierto, algunas guías incluyen medidas genéricas relacionadas con el uso apropiado de antibióticos y en particular sobre el uso de fluoroquinolonas.



II. Justificación y Objetivos



1. Justificación

El *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina (*SARM*) es una bacteria Gram (+) resistente a gran variedad de antibióticos y un importante patógeno humano. Las cepas de *SARM* son resistentes a todos los β -lactámicos debido a la proteína ligadora de penicilina (PBP2a), la cual tiene una baja afinidad por todos los β -lactámicos (Berger-Bächi y Rohrer, 2002). Esta proteína está codificada por el gen *mecA*, que reside en un elemento genético móvil denominado Cassette Cromosómico Staphylocócico (*SCCmec*). Además, las cepas de *SARM* son con frecuencia resistentes a muchos otros antibióticos.

La epidemiología de este microorganismo ha cambiado drásticamente en los últimos años, pasando de ser inicialmente un patógeno nosocomial causante de infecciones a nivel hospitalario (*HA-SARM*) (Haddadin et al., 2002; Johnson et al., 2005), a ser cada vez más común su adquisición en la comunidad entre personas que carecen de contacto con centros sanitarios (*CO-SARM*) y más reciente, un tercer grupo de cepas de *SARM* se han identificado en asociación con el ganado, especialmente cerdos, denominado como *Livestock Associated MRSA* (*LA-SARM*). Actualmente se considera que puede ser causante de enfermedad en la población (Vandenesch et al., 2003; Faria et al., 2005).

La primera colonización de *SARM* en cerdos fue comunicada en Holanda (Voss et al., 2005), donde los cerdos se consideraron como posible fuente de infección de *SARM* en humanos. Actualmente han sido identificados en gran cantidad de países (Voss et al., 2005; Guardabassi et al., 2007; van Cleef et al., 2010b), con gran diversidad de prevalencias: 81% en cerdos de Holanda (de Neeling et al., 2007) o 2.9% en cerdos de Suiza (Huber et al., 2010), incluso no lo detectan como en el estudio de Bagcigil et al (2007) en Turquía (Bagcigil et al., 2007) y en el

de Horgan (Horgan et al., 2010) en Irlanda. Además de encontrarse en cerdos, también se han encontrado en otros animales como perros, caballos, ganado vacuno, pollos, etc. (Alves et al., 2009; Cuny et al., 2010; Faires et al., 2010; Weese, 2010).

Estudios realizados han documentado la transmisión de *SARM* entre cerdos y granjeros y sus familiares (Huijsdens et al., 2006; van Loo et al., 2007a; Denis et al., 2009), destacando especialmente un trabajo realizado en Holanda que indica que los granjeros de cerdos son más propensos a ser colonizados por *SARM* (x760) que la población general (Voss et al., 2005).

A nivel hospitalario ha sido comunicado el primer brote de *SARM* de origen porcino (Wulf et al., 2008b), indicando que no sólo es un patógeno humano sino también un patógeno zoonótico, afectando a aquellas personas que trabajan estrechamente con animales, especialmente el cerdo.

Estudios realizados confirman la detección de *SARM* en carne con porcentajes de positividad variables (van Loo et al., 2007b; Lin et al., 2009; Lozano et al., 2009; Pu et al., 2009; de Jonge et al., 2010). Aunque en la actualidad no se ha relacionado la adquisición de *SARM* por comer carne contaminada, es preocupante el hecho de que el *SARM* haya entrado en la cadena alimentaria.

En una revisión realizada por Otter y French (Otter y French GL., 2010), indican que dado el aumento de infecciones por *SARM* que han surgido en Europa, sobre todo del clon ST398 asociado al cerdo, es necesario aumentar la comprensión de la epidemiología de estas infecciones, para guiar las nuevas iniciativas de control y evitar que se conviertan en infecciones endémicas en Europa.

2. Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

- Determinar la prevalencia de colonización de *SARM* en cerdos en la isla de Tenerife.
- Determinar la prevalencia de colonización de trabajadores del sector porcino.
- Realizar la tipificación genética de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, tanto en cerdos como en trabajadores del sector porcino.
- Determinar el perfil de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas tanto en cerdos como en personal del sector porcino.



III. Material y Métodos



1. Introducción

En la isla existen principalmente dos razas porcinas que son el *Cerdo Negro Canario* y *Cerdo Landrace*. La primera de ellas es minoritaria y se encuentra actualmente en proceso de recuperación de la especie y su origen aún no ha sido determinado, aunque la mayoría de los autores afirma que los ancestros de la raza llegaron acompañando a los primeros pobladores de las islas procedentes del norte de África y constituyen hoy día el último reducto de estas poblaciones porcinas. La raza de cerdo *Landrace*, cuyo origen es danés está ampliamente distribuida por España, es mayoritaria en la isla debido a su uso en la industria cárnica. Las muestras analizadas en este estudio corresponden a cerdos de esta raza procedentes de granjas de la isla de Tenerife.

Todos los cerdos que van a ser sacrificados deben acudir al Matadero Insular de Tenerife (MIT), ya que todo animal que va a ser sacrificado cumpliendo con la exigente legislación de la Unión Europea, debe acudir a esta institución de manera que se asegure la calidad higiénico-sanitaria de la misma y la pertinente inspección veterinaria del animal por parte de un veterinario.

El método de sacrificio para el ganado porcino empleado en la actualidad en el MIT es mediante cámara de dióxido de carbono y posterior sangrado del animal. Los cerdos fueron transportados al MIT en vehículos propios de cada granja, un máximo de 24 horas antes de su sacrificio y durante su permanencia en el matadero los cerdos permanecen estabulados por granjas, ya que son animales muy territoriales y pueden surgir rivalidades entre machos de distintos "clanes".

2.

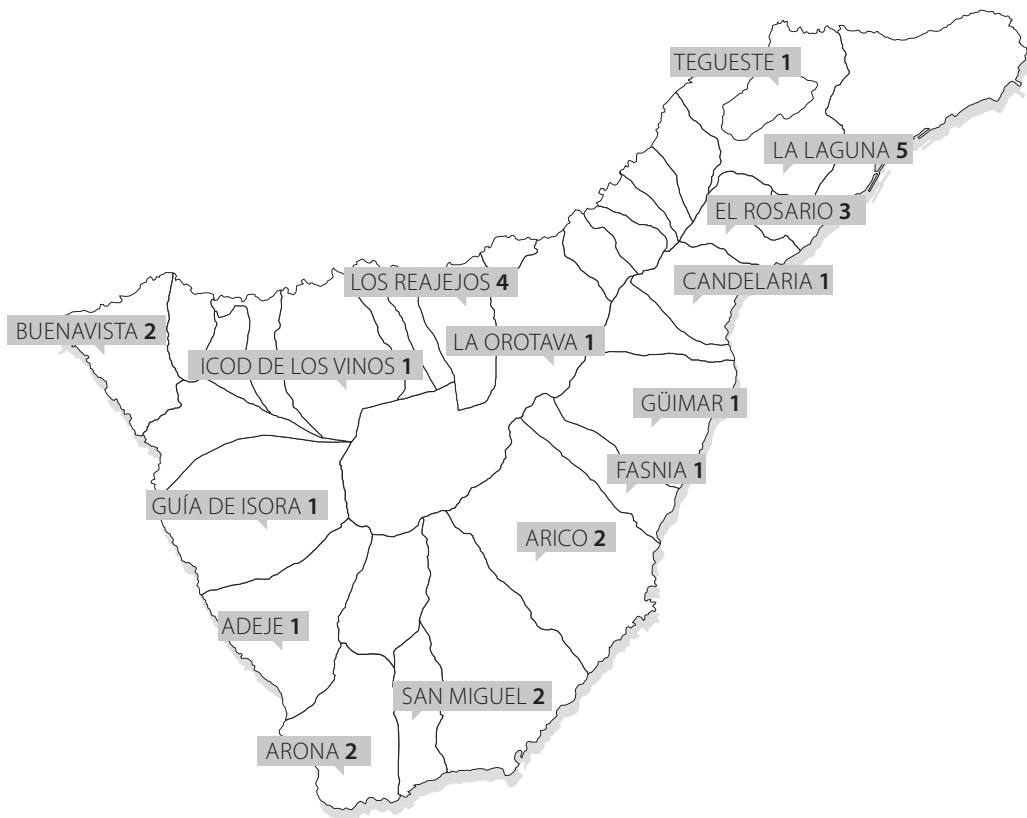
Distribución y tamaño de las granjas

En la isla de Tenerife se encuentran 43 granjas porcinas. De estas, fueron seleccionadas de forma aleatoria 28 granjas distribuidas por todo el territorio insular atendiendo a criterios de localización geográfica y procedencia (figura 3.1). Así, hemos dividido las granjas según el número de cerdas reproductoras en granjas pequeñas (1–10), medianas (11–100) y grandes (> 100) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1– Granjas muestreadas en los distintos municipios de la isla de Tenerife.

MUNICIPIO	GRANDE	MEDIANA	PEQUEÑA	TOTAL
La Laguna	2	3		5
Arona	1		1	2
Güímar	1			1
El Rosario	1	2		3
Guía de Isora		1		1
Arico	1	1		2
Icod de los Vinos	1			1
Candelaria			1	1
Adeje	1			1
Fasnia	1			1
Tegueste	1			1
Buenavista del Norte	1	1		2
La Orotava	1			1
Los Realejos	1	2	1	4
San Miguel	1		1	2

Figura 3.1– Distribución geográfica de las granjas incluidas en el estudio.



3.

Muestras de origen animal

Las muestras fueron tomadas por el personal veterinario del MIT, justo antes del momento del sacrificio del animal y mientras éste permanecía inconsciente, evitando así los inconvenientes de mantener inmovilizado a un animal de grandes dimensiones y la resistencia que pudiera presentar el animal a dicha toma. Clasificamos las muestras en dos grupos dependiendo de la edad del animal, distinguiendo así entre cerdo de **cebo/engorde** (< 6 meses de vida) y **lechón** (< 1 mes de vida).

Durante el periodo comprendido entre noviembre 2009 y enero 2011, se tomaron muestras nasales y rectales de 300 cerdos seleccionados de forma aleatoria procedentes de las granjas incluidas en el estudio, 279 de cerdos de cebo y 21 de lechones, que fueron clasificadas según el tamaño de la granja de origen (Tabla 3.2).

Tabla 3.2– Número cerdos seleccionado según grupo de edad y tamaño de la granja; Grande: >100 cerdos; mediana: 11–100 cerdos; pequeña: <10 cerdos

TAMAÑO DE LA GRANJA	Nº. DE GRANJAS	Nº. DE MUESTRAS	CEBO	LECHÓN
Grande	14	245	231	14
Mediana	10	41	36	5
Pequeña	4	14	12	2
TOTAL	28	300	279	21

4.

Muestras de origen humano

Con la finalidad de detectar portadores de *SARM* entre los trabajadores del sector porcino, bien en granjas de cría o en el matadero, se realizó una búsqueda activa de portadores. Se solicitaron los permisos oportunos y se les informó sobre los objetivos y la finalidad del estudio, dando su consentimiento, con una participación del 100%.

Con el objetivo de recabar información, se diseñó un sencillo cuestionario que fue cumplimentado en el momento de la recogida de la muestra en todos aquellos casos que accedieron a participar en el estudio. Este cuestionario está basado en el realizado por Smith et al. 2009, e incluye los siguientes *items*:

- Edad
- Tiempo que lleva trabajando en contacto con cerdos (años)
- Tarea que realiza
- Número de cerdos que manipula/día
- ¿Extrae sangre?
- ¿Ha visitado el hospital en los últimos 12 meses?
- Infecciones en la piel, heridas que tardan en curar, etc.

5.

Toma de muestras

5.1. Muestras de origen animal.

A cada cerdo se le realizaron dos tomas de muestra, una nasal y otra rectal. Para ello se empleó una torunda con medio de conservación *Amies Rayon* (Deltalab™). Previo a la toma de la muestra se anotó la fecha, granja de procedencia y origen de la toma de muestra (nasal o rectal). La toma nasal se llevó a cabo introduciendo la torunda por ambas fosas nasales unos 10 cm de profundidad y realizando pequeños giros a ambos lados. Para la toma rectal se introdujo la torunda 1 o 2 centímetros por el orificio anal y posterior frotis de la zona perianal. Posteriormente las muestras se conservaron en nevera isotérmica a 4°C hasta su recepción en el laboratorio, siempre dentro de las 24 horas posteriores a la toma.

5.2. Muestras de origen humano.

Se tomaron un total de 54 muestras de origen humano, que corresponden a personal del Matadero Insular de Tenerife, así como ganaderos, transportistas y empleados de las granjas de procedencia de las muestras tomadas en cerdos. La zona de toma de la muestra fue la mucosa nasal, introduciendo la torunda y haciéndola girar en el vestíbulo nasal (tabique y cara interna de aletas nasales). En aquellas personas que presentaban heridas recurrentes en la piel se les realizó una toma de muestra en la lesión.

6. Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*

Una vez tenemos la muestra en el laboratorio, rotulamos un tubo *ependorf* por muestra y le añadimos caldo corazón–cerebro (BHI o *Brain Heart Infusion*; Panreac™, Barcelona, España) al 7% cloruro sódico (NaCl). Posteriormente se introduce la torunda con la muestra, se parte por el extremo distal y se incuba en estufa (Selecta™, Barcelona, España) a 37°C durante 24 horas. Este caldo favorece la proliferación de la carga bacteriana de *Staphylococcus aureus* en aquellas muestras que pueden presentar baja carga de esta bacteria y limitar el crecimiento de otros microorganismos debido al elevado contenido en sales.

Transcurridas 24 horas se realiza una siembra en placas agar cromogénico *chromID MRSA* (bio-Mérieux S.A., Marcy–l’Etoile, France) previamente atemperadas. Estas placas permiten la identificación directa de cepas *SARM* mediante el desarrollo espontáneo de una coloración verde (verde malaquita) en las colonias productoras de alfa–glucosidasa y la presencia del antibiótico cefoxitina, para el cual son resistentes.

Pasadas 24 horas procedemos a la lectura de las placas y en caso de negatividad las reincubamos hasta las 48 horas a 37°C.

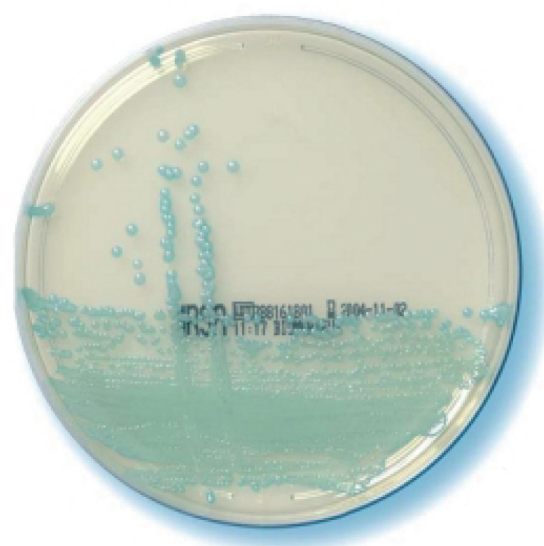


Figura 3.2– Colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en agar cromogénico.

6.1. Identificación de *Staphylococcus aureus* (SLIDEX STAPH PLUS).

Principio:

Es un test rápido de aglutinación de partículas de látex para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* a partir de aislamiento en medios de cultivo. El reactivo Slidex Staph Plus™ (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, France) contiene partículas de látex azul sensibilizadas mediante fibrinógeno humano y anticuerpos monoclonales. De esta forma permite la detección simultánea del factor de afinidad por el fibrinógeno, de la proteína A por el fragmento FC de los IgG de ratón y de un antígeno de grupo ligado a las estructuras periféricas específicas del *Staphylococcus aureus*.

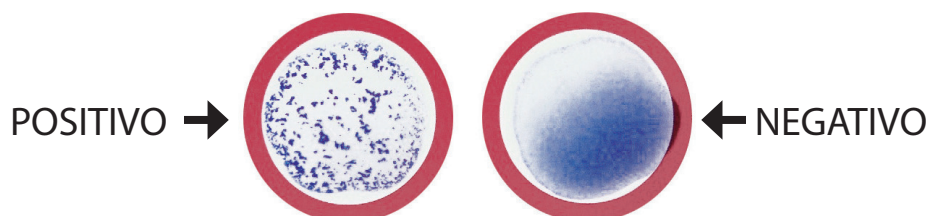
Procedimiento:

Para el procesado de las muestras debemos atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente y homogeneizar los mismos de manera cuidadosa, evitando la formación de burbujas en el cuentagotas. Elegimos una tarjeta desechable y en uno de los círculos depositamos una gota del reactivo R1 (látex anti *Staphylococcus aureus*) para posteriormente agregar las colonias sospechosas (anticuerpo) con un asa de siembra (1 ó 2 colonias sospechosas). Posteriormente, mezclamos cuidadosamente durante 10 segundos con ayuda del asa de siembra y lo extendemos sobre la superficie del círculo realizando ligeros movimientos de rotación durante 20 segundos. Transcurrido este tiempo procedemos a la lectura del ensayo e interpretamos los datos.

Interpretación de resultados:

Se interpretan como positivas aquellas muestras en la que observamos aglutinación (figura 3.3).

Figura 3.3– Test de aglutinación Slidex Staph Plus™ para la identificación de *S. aureus*.



6.2. Identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA–Screen)

Principio:

Es un test para la detección rápida de PBP2' presente en aislamientos de *Staphylococcus aureus* para la identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. La *penicillin binding protein 2'* (PBP2') se encuentra en la membrana celular del SARM. MRSA–Screen™ (Denka Seiken Co, Japan) consiste en un reactivo sensibilizado con anticuerpos monoclonales frente a PBP2' y reactivos de extracción de PBP2' a partir de bacterias.

Procedimiento:

A partir de un cultivo fresco (menos de 24h), cogemos con un asa de siembra 4–5 colonias de 2,5 mm de diámetro y las resuspendemos en un tubo de microcentrífuga en el que previamente hemos añadido 4 gotas del reactivo *Extraction Reagent–1*. Acto seguido, lo ponemos en un termo–bloque a 95°C durante 3 minutos y posteriormente lo dejamos enfriar a temperatura ambiente para añadirle una gota del reactivo *Extraction Reagent–2*. Mezclamos bien y centrifugamos 5 minutos a 3000rpm.

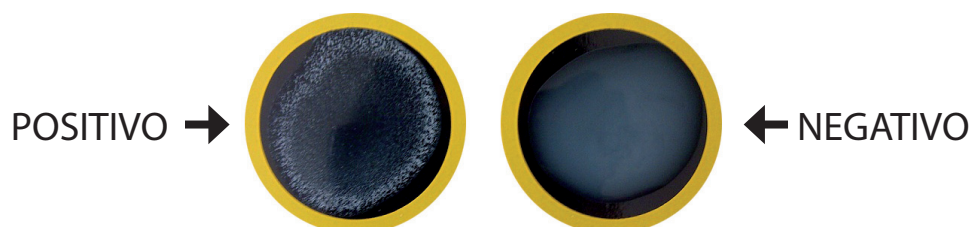
Para la prueba de aglutinación, trabajaremos sólo con el sobrenadante. El procedimiento se detalla a continuación.

1. Añadir 50 µl del sobrenadante a cada círculo.
2. Al círculo 1 añadir una gota del reactivo *Sensitized Látex*.
3. Al círculo 2 añadir una gota del reactivo *Control Látex*.
4. Rotar la tarjeta durante 3 minutos.

Interpretación de los resultados:

Se interpretan como positivas aquellas muestras en la que observamos aglutinación (figura 3.4).

Figura 3.4– Test de aglutinación MRSA Screen™ para la identificación de SARM.



7.

Extracción y purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó de manera automatizada mediante el equipo *Maxwell*[™] 16 (Promega[™], Madison, USA). Este sistema automatizado procesa de 1 a 16 muestras en un tiempo de 30 minutos partiendo de la suspensión bacteriana.

Procedimiento:

Se toman 2–3 colonias frescas (cultivo de menos de 24 horas) y se resuspenden en suero fisiológico 0,9% (B–Braun[™], España). Posteriormente, preparamos la *Solución de Lisis* a partir de 200 µl de buffer de lisis más 20 µl de proteinasa K. A continuación se pipetea en un tubo *ependorf* 200 µl de la muestra y 220 µl de la solución de lisis y se mezclan bien. Pipeteamos todo el volumen (420 µl) del *ependorf* en el cartucho de extracción y colocamos una punta en la última posición del cartucho. Por último, colocamos en la gradilla los *ependorf* de eluido con 50 µl de agua destilada y se procede a poner en marcha el sistema.

El ADN se obtiene transcurridos 45 minutos y lo mantenemos en congelación (preferiblemente a –80°C) hasta el momento de su procesamiento.

8.

Amplificación del gen *mecA*

Una vez hemos obtenido el ADN mediante el protocolo automatizado de extracción (Maxwell™ 16), amplificamos el gen *mecA* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El gen *mecA* es un gen que codifica la PBP2' (penicillin binding protein o PBP2'), que es aquella que confiere resistencia a los β -lactámicos, entre ellos la penicilina.

Procedimiento:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La preparación del "Mix" de los reactivos que intervienen en la amplificación debe realizarse a baja temperatura para mantener inactivas las enzimas que intervienen en la reacción. Colocamos el número necesario de *eppendorf* en un bloque de enfriamiento y preparamos el Mix. Para ello añadimos por cada muestra a amplificar:

- 30,85 μ l de agua destilada estéril.
- 10 μ l de Polimejor 5X.
- 5 μ l 10X PCR Buffer (15 mM Mg, pH 9), (Promega™, Madison, USA).
- 2 μ l de dNTPs 2,5 mM (Promega™, Madison, USA).
- 1 μ l de la mezcla de primers a 25 μ M (*MecA*-1 y *MecA*-2).
- 0,15 μ l de Taq polimerasa a 10U / μ l.

En la reacción de amplificación se usó *Polimejor* (Sucrosa 0,35 M, Cresol 80 μ g/ml) por su capacidad de incrementar la eficacia de la PCR.

Condiciones:

El termociclador (iQ5 Real Time PCR, BIORAD) debe realizar la siguiente programación:

- 3 minutos a 95°C.
- 30 ciclos:
 - Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto.
 - Hibridación: 60°C durante 1 minuto.
 - Extensión: 72°C durante 1 minuto.
- 10 minutos a 72°C.

Los *primers* utilizados para esta PCR son los siguientes:

- *MecA*-1: 5'-(1319) GGG GTC GTT ACA ACG TTA CAA G (1341)-3'
- *MecA*-2: 5'-(1814) AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C(1836)-3'

Interpretación de los resultados:

Los resultados se muestran a tiempo real. Si hay amplificación del gen *mecA*, muestra pertenece a un *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (*SARM*).

9. Amplificación del Cassette Cromosómico Estafilocócico (*SCCmec*)

Una vez hemos obtenido el ADN mediante el protocolo automatizado de extracción (*Maxwell™ 16*), amplificamos el *SCCmec* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Procedimiento:

PCR.

El procedimiento debe realizarse a baja temperatura para mantener inactivas las enzimas que intervienen en la reacción, evitando así que la reacción empiece antes de tiempo. Colocamos el número necesario de *eppendorf* en un bloque de enfriamiento, uno por cada muestra de ADN y dos más para los controles negativo y positivo. Posteriormente preparamos el *Mix* para la reacción. Para ello añadimos por cada muestra a amplificar:

- 9,6 µl de agua destilada.
- 5 µl 5X *Polimejor*.
- 2,5 µl 10X PCR Buffer (30 mM Mg, pH 9).
- 1,5 µl MgCl₂.
- 2 µl 2,5 mM dNTPs.
- 0,5 µl Taq polimerasa (5U/µl).
- 2,5 µl primer mix (82 µl TE + 8 µl cada *primer*).

En cada *eppendorf* dispensamos 24 µl del *Mix* y añadimos 1 µl del ADN correspondiente (volumen final por tubo *eppendorf*: 25 µl).

La amplificación se realiza en un termociclador (iCycler, Bio–Rad Laboratories™, USA) de manera automatizada y con los siguientes ciclos:

- 4 minutos a 95°C.
- 30 ciclos:
 - Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos.
 - Hibridación: 53°C durante 90 segundos.
 - Extensión: 72°C durante 60 segundos.
- 15 minutos a 72°C.

En la reacción de amplificación se usó *Polimejor* (Sucrosa 0,35M, Cresol 80 µg/ml) por su capacidad de incrementar la eficacia de la PCR.

Electroforesis.

Para poder visualizar el ADN amplificado realizamos una electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Pesamos 0,6 g de agarosa y los fundimos en 30 ml de TBE 0,5X. Se hierve y tras atemperarlo lo vertemos con cuidado sobre el soporte con el peine correspondiente al número de muestras que queremos analizar. Dejar solidificar.

Cuando el gel está solidificado llenamos la cubeta de electroforesis con tampón TBE 0,5X, introducimos el gel en la cubeta de electroforesis y sacamos el peine del gel con cuidado de no romper los pocillos resultantes.

Posteriormente pasamos a cargar los pocillos con 5 µl de la muestra amplificada y dejamos libre un pocillo para cargar el correspondiente peso molecular. Conectamos los electrodos (comprobar que el gradiente es del polo negativo al positivo) y ponemos en marcha la electroforesis.

Finalizada la electroforesis realizamos la tinción del gel. Para ello teñimos el gel en una solución de bromuro de etidio (500 ml de TBE 0,5X y 250 µl de bromuro de etidio al 1%) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo visualizamos el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y guardamos una copia de la fotografía resultante.

10. Estudio de genotipado. Electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)

La tipificación molecular de microorganismos mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE) tiene como objetivo conocer la relación epidemiológica entre las distintas cepas aisladas. Mediante esta técnica separamos fragmentos de ADN cromosómicos de elevado tamaño mediante una técnica especial de electroforesis, en la que se aplican campos eléctricos de incidencia pulsante. Mediante este sistema se consigue dividir el cromosoma bacteriano en patrones sencillos, de 10 a 20 bandas, lo cual facilita la comparación entre las distintas cepas, permitiendo establecer diferentes grados de similitud genética entre las bacterias estudiadas.

Esta técnica se caracteriza por poseer un alto poder discriminatorio y es el método de elección para este tipo de estudios.

Procedimiento:

El protocolo empleado está basado en el descrito por Montesinos et al., 2002, y puede dividirse en las siguientes fases:

10.1. Siembra en placa.

Las colonias con las que se inicia el protocolo de electroforesis en gel de campos pulsantes deben ser frescas, es decir, con menos de 24 horas de incubación. Las sembramos en agar sangre a 37°C durante 24 horas.

10.2. Preparación del inóculo.

El inóculo se prepara en caldo LB (Luria–Bertoni). Para ello cogemos aproximadamente 3–4 colonias del microorganismo en cultivo en agar sangre e incubamos en estufa a 37°C durante 18 horas.

10.3. Extracción del ADN cromosómico.

Determinación del inóculo del microorganismo.

Para trabajar con una cantidad de ADN adecuada, debemos tener un crecimiento bacteriano adecuado y que determinaremos mediante el empleo de un espectrofotómetro. Para ello medimos la absorbancia a 540nm y en función de la densidad óptica obtenida, trabajaremos con uno u otro volumen de muestra.

- 0,6–0,7 se cogerán 10 ml de inóculo.
- 1,3 se cogerán 7 ml de inóculo.
- > 1,5 se cogerán 5 ml de inóculo.

Centrifugamos el volumen escogido durante 10 minutos a 3000 rpm y descartamos el sobrenadante. El *pellet* o sedimento lo resuspendemos en 4–5 ml de PET IV con la ayuda de un vortex y lo centrifugamos nuevamente durante 10 minutos a 3000 rpm. Una vez centrifugado, descartamos el sobrenadante y resuspendemos el sedimento o pellet en 1 ml de PET IV.

10.4. Preparación de los insertos.

Antes de comenzar, los moldes de los insertos deben limpiarse con agua destilada, alcohol y nuevamente con agua destilada. Una vez secos, se sellan en su parte inferior con cinta adhesiva.

Los insertos se preparan con agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% (Certified Low Melt Agarose, Bio–Rad Laboratories™, USA), que se mantiene a 40–45°C en un termobloque hasta el momento de la preparación del inserto. Para ello se mezclan 300µl de agarosa y 300µl de la suspensión de microorganismos con PET IV en un tubo de microcentrífuga, quedando a una concentración final de agarosa del 0,8%. La mezcla resultante permite la obtención de entre 5 y 6 insertos (100 µl/ inserto) que solidifican a 4°C durante 40–50 minutos.

10.5. Lisis celular.

Una vez solidificados los insertos se transfieren a un tubo de 5 ml mediante la ayuda de una pera de goma. En cada tubo dispensaremos la correspondiente solución de lisis que está constituida por:

- Tampón de Lisis I (2 ml/muestra)
- Lisozima 100 mg/ml (20 μ l/muestra) (Lysozima, Sygma™, Saint Louis, USA)
- Lisostafina 15 mg/ml (8 μ l/muestra) (Lysostaphin, Sygma™, Saint Louis, USA)
- RNAsa 10 mg/ml (4 μ l/muestra) (Ribonuclease A, Sygma™, Saint Louis, USA)

Los insertos se dejan en incubación durante 24 horas a 37°C y transcurrido este tiempo se descarta el tampón de Lisis I y se sustituye por 2 ml de tampón de Lisis II con el fin de inhibir las nucleasas y eliminar las proteínas que puedan permanecer unidas al ADN. Los insertos se incuban durante 48 horas a 50–55°C. Tanto la lisis celular, como posteriormente la digestión enzimática tendrán lugar en el mismo inserto por difusión a través de la agarosa.

Transcurrido este tiempo se guardan a 4°C donde pueden permanecer hasta un año.

10.6. Lavado de los insertos.

Para poder llevar a cabo la digestión enzimática del ADN, es necesario realizar una serie de lavados que eliminen los detergentes empleados para la lisis celular ya que pueden inactivar las enzimas de restricción.

Para ello, transferimos un inserto (aquel con el que continuaremos durante el resto del proceso) a un tubo estéril de 10 ml y le añadimos 4–5 ml de tampón TE donde lo dejamos a 4°C durante 18 horas.

Se realizan dos lavados más antes de realizar la digestión enzimática. En este punto, los insertos pueden permanecer durante un periodo de 1 mes.

10.7. Digestión enzimática de los insertos (Macrorrestricción).

Las endonucleasas (enzimas) que se emplean en el análisis de restricción del ADN cromosómico en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsante, presentan una baja frecuencia de corte, de manera que se generan fragmentos de gran tamaño y poco numerosos.

Para la digestión enzimática no emplearemos el inserto en su totalidad, sino que cortaremos un fragmento, entre 1/3 y 1/4 del inserto, ayudándonos con un cubreobjetos y un portaobjetos.

Por cada muestra (inserto) dispensaremos 200 μ l que se corresponden con:

- 148 μ l de agua estéril.
- 2 μ l de BSA.
- 30 μ l de enzima *Apal* (Promega™, Madison, USA).
- 20 μ l de tampón A (específico para la enzima *Apal*) (Promega™, Madison, USA).

Las muestras (insertos) permanecen en incubación a 37°C (temperatura específica para la enzima) durante 18 horas.

10.8. Preparación del gel de agarosa.

Vamos a trabajar con agarosa al 1%. Preparamos un gel de agarosa al 1% en TBE 0,5X. Para ello añadimos 1 gramo de agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, Bio–Rad Laboratories™, USA) a 100 ml de TBE 0,5X, mezclamos bien y dejamos hervir hasta en tres ocasiones para lograr su correcta fusión. Mientras dejamos que la agarosa se enfríe (aproximadamente 30 minutos), preparamos el molde donde vamos a preparar el gel. Debemos limpiar previamente el soporte y el peine correspondiente a quince pocillos con agua destilada antes de verter la agarosa, de manera que eliminemos el posible polvo y suciedad que posteriormente se conviertan en artefactos que dificulten el revelado del gel. Una vez colocado el peine colocaremos los insertos de manera consecutiva en cada uno de los dientes del peine, dejando libres las posiciones de los extremos y una central para colocar el peso molecular (Lambda Ladders, Promega–Markers™, Madison, USA). Cuando la agarosa se halla enfriado la vertemos cuidadosamente evitando que ésta arrastre alguno de los insertos y esperamos a que el gel solidifique (aproximadamente 20 minutos).

10.9. Colocación en el sistema CHEF–DRIII.

De todos los sistemas desarrollados, el más extendido ha sido el CHEF (Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis). Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, que hacen mucho más fácil la comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal (figura 3.5).

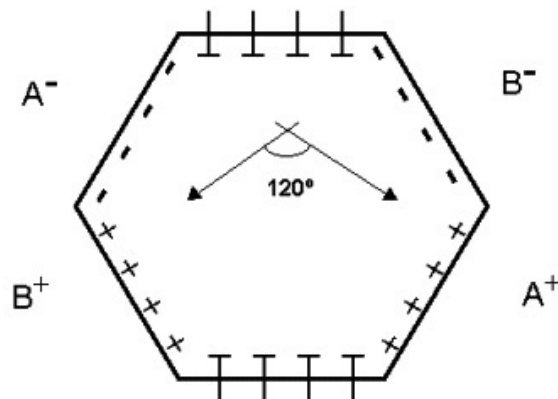


Figura 3.5– Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.

El aparato utilizado es el CHEF-II (BioRad Laboratories™, USA). Se preparan tres litros de tampón de electroforesis TBE 0,5X (300 ml TBE 5X en 2700 ml de agua destilada miliQ) y se vierten en la cubeta de electroforesis hasta el nivel correspondiente. En este momento, ponemos en marcha el sistema de acuerdo con los siguientes parámetros:

- Controlador de pulsos:
 - Bloque I: 6 μ /cm, 12 horas, pulso inicial 5 segundos y pulso final 15 segundos.
 - Bloque II: 6 μ /cm, 12 horas, pulso inicial 15 segundos y pulso final 40 segundos.
- Bomba de recirculación del tampón de electroforesis. Debe programarse a una velocidad aproximada de 1 L por minuto y nunca debe ponerse en marcha con la cubeta vacía.
- Refrigerador. Debe programarse a 14°C.
- Desmontar el molde que contiene el gel y depositarlo, sujeto a la bandeja, en la cubeta de PFGE. Antes de introducirlo en la cubeta, debemos eliminar la agarosa sobrante que pueda haber quedado adherida al gel de manera que evitemos posibles obstrucciones del sistema. Debe comprobarse que la cubeta tiene el marco adecuado para la bandeja, ajustar la misma en el espacio correspondiente y cerrar la tapa de la cubeta.
- Conectar los electrodos y poner en marcha el sistema.

10.10. Extracción del gel y tinción.

Una vez finalizada la PFGE, abrimos la tapa y extraemos el gel junto con la bandeja. Con cuidado, deslizamos el gel sin la bandeja dentro de la solución de bromuro de etidio (500 ml de TBE 0,5X y 250 μ l de bromuro de etidio al 1%) y lo dejamos a temperatura ambiente y agitación durante 20 minutos.

Transcurrido este tiempo visualizamos el gel en el transiluminador bajo luz ultravioleta y guardamos una copia de la fotografía resultante.

10.11. Análisis de las imágenes obtenidas.

El término de análisis de imágenes hace referencia a la comparación de dos o más patrones de bandas correspondientes a las distintas cepas. El objetivo de la comparación de los patrones de bandas, especialmente en la detección de brotes, es determinar la existencia de identidad entre patrones (tanto en el número como en la posición de las bandas). Un objetivo adicional, serían los estudios poblacionales realizados durante largos periodos de tiempo, en el que se intenta determinar el grado de similitud que existe entre cada par de patrones que se están estudiando.

Para realizar la comparación, existen comercializados distintos software específicos. En este análisis hemos utilizado el InfoQuest™ FP software.

El primer paso del análisis es asignar los pesos moleculares a las distintas bandas en función de la movilidad electroforética. Para ello se requiere de un marcador de peso molecular. A continuación, el siguiente paso consiste en determinar el grado de homología entre dos patrones a partir del número de bandas compartidas y no compartidas.

La representación del grado de similitud se realizó mediante el dendrograma, el cual es el sistema de representación gráfica más ampliamente utilizado por su sencilla interpretación. Este sistema clasifica los patrones jerárquicamente en forma de árbol tras compararlos entre sí, mediante el algoritmo matemático UPGMA (*Unweighted Pair Group with Mathematical Averaging*) con una posición de tolerancia del 1% y un margen de confianza del 0,5%.

Los distintos tipos y subtipos que se definen según los criterios de Tenover (Tenover et al, 1995) son:

- a. Idénticos.** Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.
- b. Genéticamente relacionados.** Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.
- c. Posiblemente relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo (> 6 meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas.
- d. No relacionados.** Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

11.

Secuenciación automática y tipificación de secuencias de locus múltiples (MLST)

Este procedimiento permite determinar las secuencias de regiones internas de siete genes altamente conservados de ~ 500 pb. Este procedimiento ha sido validado para *Staphylococcus aureus* y permite determinar, de acuerdo a secuencias conocidas disponibles en el sitio www.mlst.net, si la cepa de *Staphylococcus aureus* evaluada pertenece a clones ya conocidos o si se trata de clones nuevos. Para cada gen las diferentes secuencias se designan como alelos distintos y cada aislamiento es definido por alelos de cada uno de los siete loci determinando su perfil alélico o secuencia tipo (ST o *Sequence Type*).

11.1. Amplificación de alelos de genes *Housekeeping*.

Los siete genes *Housekeeping* o regiones genómicas altamente conservadas son amplificadas por separado usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las reacciones de amplificación son realizadas mediante el uso del termociclador PTC-100 (Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories™, USA). Los genes con sus correspondientes primers y secuencias que se utilizaron para la tipificación se muestran en la tabla 2.3.

El volumen final de la reacción es 25 µl y consta de los siguientes reactivos:

- 14,5 µl Agua destilada.
- 5 µl *Polimejor*.
- 2,5µl Buffer 10X (1,5 mM MgCl₂).
- 1µl dNTP mix 2.5 mM=100 µM de cada dNTP en la concentración final.

- 0,5 µl de primer mix 25µM.
- 1 µl ADN bacteriano.
- 0,5 µl de Taq ADN Polimerasa (Promega™, Madison, USA).

Tabla 3.3– *Primers* empleados para la amplificación de los genes empleados en la tipificación de *Staphylococcus aureus* por MLST.

GEN	PRIMER	SECUENCIA (5'-3')
Carbamate Kinase (<i>arcC</i>)	<i>arcC</i> -Up <i>arcC</i> -Dn	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
Shikimate dehydrokinase (<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> -Up <i>aroE</i> -Dn	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTATAACGATATC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> -Up <i>glpF</i> -Dn	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> -Up <i>gmk</i> -Dn	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAAC TACAACGTAATCGTA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> -Up <i>pta</i> -Dn	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
Triosephosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> -Up <i>tpi</i> -Dn	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqiL</i> -Up <i>yqiL</i> -Dn	CAGCATA CAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

Enright MC et al (2000)

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- 3 minutos a 95°C.
- 30 ciclos:
 - Desnaturalización: 94°C durante 45 segundos.
 - Hibridación: *Th* durante 30 segundos.
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos.
- 10 minutos a 72°C.
- 15°C "for ever".

La *Th* hace referencia a la temperatura de hibridación de los *primers* (Tabla 3.4).

Th (°C)	GENES
55°C	<i>arcC</i>
50°C	<i>aroE</i>
57°C	<i>glpF</i>
55°C	<i>gmk</i>
58°C	<i>pta</i>
52°C	<i>tpi</i>
55°C	<i>yqiL</i>

Tabla 3.4– Temperaturas de hibridación (Th) usadas en la amplificación de los *loci*.

Antes de comenzar la secuenciación comprobamos mediante electroforesis en gel de agarosa que sólo tenemos una única y robusta banda de ADN, ya que si existiera más de una, aparecerían solapamientos de secuencias.

11.2. Purificación enzimática del producto de PCR (EXO1–SAP).

La *Exonucleasa I* es un enzima con actividad exonucleasa que actúa sobre los primers sobrantes de la reacción de PCR, cortándolos desde el extremo 3' al 5' y descomponiéndolos en nucleótidos. Por otro lado, el enzima *SAP* (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) actúa sobre los nucleótidos desfosforilándolos quedando así inactivos. El objetivo de esta purificación es eliminar los *primers* y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) sobrantes de la PCR de manera que no interfieran en las reacciones posteriores.

El volumen final de la reacción es 4,5 µl y consta de los siguientes reactivos:

- 2,5 µl Agua destilada.
- 0,25 µl ExoI (20U / µl; Fermentas, Inc, Hanover, MD).
- 1 µl SAP (1U / µl; Fermentas, Inc, Hanover, MD).
- 0,75 µl de producto de PCR.

Las condiciones para la reacción de purificación enzimática son las siguientes:

- 37°C / 30 min.
- 80°C / 15 min (para la inactivación de los enzimas).

11.3. Reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación tiene como objetivo determinar la secuencia de nucleótidos de la región que queremos estudiar. El equipo empleado en nuestro estudio fue el ABI 3130XL (Perkin–Elmer Applied Biosystems™, Foster City, California).

El volumen final de la reacción es 6.5 µl y consta de los siguientes reactivos:

- 4,5 µl ADN purificado (paso anterior).
- 0,863 µl Agua destilada estéril.
- 0,637 µl Primer *Forward* o *Reverse* 5µM.
- 0,5 µl kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 (Perkin–Elmer Applied Biosystems™, Foster City, California).

Las condiciones para la reacción de secuenciación son las siguientes:

- 94°C / 3 minutos [94°C / 30segundos, 55°C 5segundos, 60°C 4minutos] 25 ciclos.
- 72°C 4 minutos / 4°C “*for ever*”.

11.4. Purificación de la reacción de secuenciación.

Esta purificación la realizamos mediante precipitación con Etanol / EDTA / Acetato Sódico.

A la reacción de secuenciación se añaden los siguientes reactivos:

- 0,65 µl EDTA 125 mM.
- 0,65 µl Acetato sódico 3 M.
- 16,25 µl Etanol 100% .

Mezclamos invirtiendo los tubos, sellamos con papel de aluminio e incubamos 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, centrifugamos a 4°C durante 30 minutos a 12.000 rpm. Finalizada la centrifugación, decantamos el sobrenadante y añadimos 22,75 µl Etanol 70%, para volver a centrifugar durante 15 minutos a 6270 rpm a 4°C. Decantamos el sobrenadante y secamos las muestras en Speed–Vac 15 minutos, manteniendo las muestras protegidas de la luz durante este tiempo. Resuspendemos el pellet en 15 µl de formamida desionizada (Perkin–Elmer Applied Biosystems, Foster City, California) y transferimos a la placa del secuenciador para posteriormente realizar la electroforesis capilar con el “Analizador genético ABI 3130XL” empleando para ello capilares de 36 cm y el polímero POP6™ (Perkin–Elmer Applied Biosystems, Foster City, California) junto con el software “Run 3130 XL Data Collection v3.0™” (Perkin–Elmer Applied Biosystems™, Foster City, California).

Finalizada la electroforesis pasamos al análisis de la misma mediante el software “Sequencing Analysis 5.2™” (Perkin–Elmer Applied Biosystems™, Foster City, California) del cual obtendremos un electroferograma.

11.5. Asignación, interpretación y comparación de las secuencias de locus múltiples (MLST).

De acuerdo a las secuencias obtenidas de cada uno de los 7 loci, los alelos se numeraron consecutivamente. El perfil alélico obtenido se comparó con el perfil de cepas de diversas regiones geográficas disponible en línea (www.mlst.net). Las secuencias se consideraron como alelos distintos cuando se encontró diferencias en al menos un nucleótido.

12.

Estudio de la resistencia antimicrobiana

Para realizar el estudio de resistencia antimicrobiana trabajamos con cultivos puros y frescos (colonias de menos de 24 horas). Para ello, una vez identificadas las colonias de SARM, las sembramos en una placa de agar Columbia con sangre al 5% (Agar COS) (bioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, France) durante 24 horas a 37°C. Para el estudio de resistencia antimicrobiana de los aislamientos utilizamos las tarjetas AST-P588; Estas tarjetas son específicas para el sistema VITEK 2 (bioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, France) como test para la determinación de la sensibilidad in Vitro. El VITEK 2 permite detectar de manera rápida y automatizada las resistencias bacterianas, validando e interpretando los resultados de las pruebas de sensibilidad y mecanismos de resistencia frente a los antibióticos de los distintos microorganismos.

Semanalmente se analizan distintos microorganismos de referencia a modo de control. En el caso del *S. aureus* se analiza 1 vez a la semana la identificación y antibiograma (AST P588) de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213.

Los antibióticos testados se muestran en la tabla 3.5.

Preparación del inóculo:

Se realiza mediante la técnica de patrón de turbidez. Se toma un tubo de 5 ml se le añade 3 ml de solución salina estéril al 0,85%, se toman 2 ó 3 colonias bien aisladas de un cultivo puro y se emulsionan en la solución salina. La turbidez final debe ser equivalente a 0,5 de Mc Farland.

Programar la estación de trabajo e introducir el carrusel en la bandeja del VITEK 2.

Tabla 3.5– Antibióticos testados en nuestro estudio.

GRUPO FARMACOLÓGICO	ANTIBIÓTICO
β-lactámico	Bencilpenicilina, Oxacilina
Aminoglucósidos	Gentamicina, Tobramicina
Quinolonas	Levofloxacino
Macrólido	Eritromicina
Lincosamidas	Clindamicina
Oxazolidinonas	Linezolid
Glicopéptido	Teicoplanina, Vancomicina
Gliciliclinas	Tigeciclina
Fosfonatos	Fosfomicina
Nitrofuranos	Nitrofurantoina
Bacteriostáticos	Ácido fusídico, Trimetoprima
Rifamicinas	Rifampicina
Sulfonamida	Sulfametoxazol
Streptograminas	Quinupristina/Dalfopristina
Ácido pseudomónico	Mupirocina

13. Composición de los reactivos

Bromuro de Etidio 1%.

10 µl de Bromuro de Etidio en 990 µl de agua destilada. Hacer alícuotas de 500 µl en tubos plásticos de 1 ml con tapón de rosca. Mantener a 4°C y en oscuridad.

TE.

10 mM Tris-HCl, 0,11 mM EDTA (pH 8).

Para 500 ml mezclar:

- 5 ml Tris Base 1 M pH 7.6.
- 20 µl EDTA 0,5 M pH 8.
- 495 ml agua destilada.

Autoclavar y conservar a 4°C.

TBE 5X.

1 M Tris pH 7.5, 1 M Ácido Bórico, 2 mM EDTA pH 8.

Para 500 ml mezclar:

- 27 g de Tris Base.
- 1,85 g de EDTA.
- 360 ml de agua destilada.

Mezclar bien y añadir:

- 13,75 g de Ácido Bórico.
- 140 ml de agua destilada.

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

Polimejor.

Sucrosa 0,35 M, Cresol 80 µg/ml.

PET IV.

10 mM Tris pH 7.6; 1 M NaCl.

En un bote de cristal de 500 ml añadir:

- 5 ml Tris base 1 M.
- 29,2 g NaCl.
- Completar con agua destilada.

Autoclavar y conservar a 4°C.

Tampón de Lisis I.

6mM Tris-HCl (pH 7.5); 1M NaCl; 100 mM EDTA (pH 7.5); 0,2% Desoxicolato sódico; 0,5 Brij 58, 0,2% Deoxicolato, 0,5% Sarcosilato (SLS).

En un bote de cristal de 100 ml mezclar:

- 600 µl Tris pH 7.6.
- 25 ml NaCl 4 M.
- 20 ml EDTA 0,5 M pH 7.6.
- 41,9 ml agua destilada.

Autoclavar y añadir:

- 5 ml Desoxicolato 4%.
- 2,5 ml Sarcosil 20%.
- 5 ml Brij 1%.

Conservar a 4°C.

Tampón de Lisis II.

0,5 M EDTA (pH 9–9.5), 1% Sarcosil.

En un bote de cristal de 100 ml mezclar:

- 18,6 g de EDTA.
- 80 ml de agua destilada.

- Ajustar pH (9–9.5) añadiendo 15 lentejas de NaOH (aproximadamente).

Autoclavar y añadir:

- 5 ml de Sarcosil 20%.

Conservar a 4°C.

Caldo LB.

Para 500 ml mezclar:

- 500 ml de agua destilada.
- 5 g de Triptona.
- 2,5 g de extracto de levadura.
- 5 g de Cloruro Sódico.

Dispensar 15 ml en tubos de cristal con tapón y autoclavar.

Brij 58.

Solución al 10% en agua destilada. Conservar a temperatura ambiente.

Deoxycolato 4%.

Para 50 ml añadir:

- 2 g de Deoxycolato de Sodio.
- 50 ml de agua destilada.

Conservar a temperatura ambiente.

EDTA 0,5M.

Para 100 ml mezclar:

- 18,6 g de EDTA.
- 100 ml de agua destilada.
- Añadir 10–12 lentejas de NaOH para ajustar el pH a 8.

Conservar a temperatura ambiente.

Lisoestafina.

Solución de 15 mg/ml en agua destilada. Se reparte en alícuotas de 250 µl en tubos tipo *ependorf* y congelar a –20°C.

Lisozima.

Solución de 100 mg/ml en agua destilada. Se reparte en alícuotas de 300 μ l en tubos tipo *ependorf* y congelar a -20°C .

NaCl 4 M.

Para 100 ml mezclar:

- 23,3 g de NaCl.
- 100 ml de agua destilada.

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente.

Proteína K.

Solución de 10 mg/ml en agua destilada. Se reparte en alícuotas de 500 μ l y congelar a -20°C .

RNAse-A.

Solución de 10 mg/ml en agua destilada. Debe hervirse durante 5 minutos antes de repartir en alícuotas de 600 μ l en tubos tipo *ependorf* y congelar a -20°C .

Sarcosyl 20%.

Para 100 ml añadir:

- 20 g de N-Lauroylsarcosine.
- 100 ml de agua destilada.

Conservar a temperatura ambiente.

Tris Base 1 M.

Para 100 ml añadir:

- 12 g de Trizma.
- 75 ml de agua destilada.
- Añadir HCl hasta ajustar el pH a 7.6 (USAR GUANTES Y MASCARILLA)
- Completar con agua hasta 100 ml.

Conservar a temperatura ambiente.

14. Análisis estadístico

La muestra se describe resumiendo cada variable mediante la frecuencia relativa de aparición de cada una de sus categorías debido a su escala nominal.

Las comparaciones de frecuencias para estas variables entre grupos se realizan mediante la prueba chi-cuadrado de Pearson o Exacta de Fisher cuando las tablas de contingencia son del tipo 2x2 y no se puede aplicar la primera.

Todos los cálculos se realizan con el paquete estadístico de ordenador SPSS 17.0 para Windows de IBM Co TM.

IV. Resultados

1. Aislamiento de *SARM* en muestras nasales de cerdos

Todos los resultados que mencionaremos son referidos a muestras nasales, ya que en ningún caso la muestra rectal resultó positiva si la nasal era negativa.

En la tabla 4.1 se muestran el número de aislamientos de *SARM* según las 27 granjas de procedencia de los cerdos. El porcentaje de positividad de las muestras de cerdos fue del 85,3%.

Tabla 4.1– Aislamientos de *SARM* en muestras nasales de cerdo, distribuidas por municipio y granjas de origen.

GRANJA	MUNICIPIO	TAMAÑO	TOTAL	MUESTRAS (+)	% POSITIVOS
1	Adeje	Grande	16	16	100
2	Arico	Mediana	3	2	66,7
3	Arico	Grande	27	24	88,9
4	Arona	Grande	11	11	100
5	Arona	Pequeña	2	2	100
6	Buenavista del Norte	Grande	18	16	88,9
7	Buenavista del Norte	Mediana	2	2	100
8	Candelaria	Pequeña	1	0	0
9	El Rosario	Mediana	6	6	100
10	El Rosario	Grande	28	20	71,72
11	El Rosario	Mediana	1	1	100
12	Fasnia	Grande	20	20	100
13	Guía de Isora	Mediana	3	3	100
14	Güímar	Grande	33	29	87,87

→

→

15	Icod De Los Vinos	Grande	15	15	100
16	La Laguna	Mediana	2	2	100
17	La Laguna	Grande	32	27	84,37
18	La Laguna	Grande	16	11	68,75
19	La Laguna	Mediana	5	4	80
20	La Laguna	Mediana	10	10	100
21	La Orotava	Grande	20	15	75
22	Los Realejos	Mediana	8	3	37,50
23	Los Realejos	Mediana	1	1	100
24	Los Realejos	Grande	6	6	100
25	Los Realejos	Pequeña	8	4	50
26	San Miguel	Grande	2	2	100
27	San Miguel	Pequeña	3	3	100
28	Tegueste	Grande	1	1	100
TOTAL			300	256	85,3

1.1. Cerdos de cebo.

En la tabla 4.2 se muestra la prevalencia en *SARM* de las muestras de cerdo de cebo según su granja de origen. El 84,2% (235/279) fueron positivos y sólo una de las 28 granjas testadas resultó negativa para *SARM*, la ya mencionada nº 8.

Tabla 4.2– Aislamientos de *SARM* en muestras de cerdo de cebo, distribuidas por granjas

NÚMERO	MUNICIPIO	TAMAÑO	TOTAL	MUESTRAS (+)	% POSITIVOS
1	Adeje	Grande	15	15	100
2	Arico	Mediana	3	2	66,7
3	Arico	Grande	25	22	88
4	Arona	Grande	11	11	100
6	Buenavista del Norte	Grande	18	16	88,9
7	Buenavista Del Norte	Mediana	2	2	100
8	Candelaria	Pequeña	1	0	0
9	El Rosario	Mediana	6	6	100
10	El Rosario	Grande	28	20	71,3
11	El Rosario	Mediana	1	1	100
12	Fasnia	Grande	20	20	100
13	Guía De Isora	Mediana	3	3	100
14	Güímar	Grande	32	28	87,5

→

→

15	Icod De Los Vinos	Grande	15	15	100
16	La Laguna	Mediana	2	2	100
17	La Laguna	Grande	22	17	77,3
18	La Laguna	Grande	16	11	68,7
19	La Laguna	Mediana	5	4	80
20	La Laguna	Mediana	5	5	100
21	La Orotava	Grande	20	15	75
22	Los Realejos	Mediana	8	3	37,5
23	Los Realejos	Mediana	1	1	100
24	Los Realejos	Grande	6	6	100
25	Los Realejos	Pequeña	8	4	50
26	San Miguel	Grande	2	2	100
27	San Miguel	Pequeña	3	3	100
28	Tegueste	Grande	1	1	100
TOTAL			279	235	84,2

1.2. Lechones.

En la tabla 4.3 se muestra que la prevalencia de *SARM* de las muestras de lechones es del 100% (21/21). Se incluyeron muestras procedentes de 6 granjas y todas resultaron positivas. Si comparamos el porcentaje de positividad de los cerdos de cebo en relación a los lechones, se obtienen diferencias significativas ($p = 0,031$), siendo el porcentaje de lechones positivos superior al de cerdo de cebo.

Tabla 4.3– Aislamientos de *SARM* en muestras de lechones, distribuidas por granjas.

NÚMERO	MUNICIPIO	TAMAÑO	TOTAL	POSITIVOS
1	Adeje	Grande	1	1
3	Arico	Grande	2	2
5	Arona	Pequeña	2	2
14	Güímar	Grande	1	1
17	La Laguna	Grande	10	10
20	La Laguna	Mediana	5	5
TOTAL			21	21

2. Aislamiento de *SARM* en cerdos según tamaño de granja

2.1. Cerdos de cebo.

En la tabla 4.4 se muestra la distribución de las muestras de cerdo de cebo según el tamaño de la granja (grande, mediana y pequeña), así como la prevalencia de *SARM* según grupo de edad de los animales. Se observa que el porcentaje de cerdos positivos es mayor en las granjas de mayor tamaño, si bien esta diferencia no es significativa.

Tabla 4.4– Aislamientos de *SARM* en el total de muestras según tamaño de la granja y edad de los cerdos.

TAMAÑO GRANJA	GRANJAS	N	CEBO (+)	% POSITIVOS
Grande	14	231	199	86
Mediana	10	36	29	80,5
Pequeña	4	12	7	58,2
TOTAL	28	279	235	

Grande: >100 cerdos; mediana: 11–100 cerdos; pequeña: <10 cerdos.

2.2. Lechones.

En la tabla 4.5 se puede observar que todas las muestras son positivas y no hay diferencias según el tamaño de la granja.

Tabla 4.5– Aislamientos de *SARM* en el total de muestras según tamaño de la granja y edad de los cerdos.

TAMAÑO GRANJA	GRANJAS	N	MUESTRAS (+)
Grande	4	14	14
Mediana	1	5	5
Pequeña	1	2	2
TOTAL	6	21	21

Grande: >100 cerdos; mediana: 11–100 cerdos; pequeña: <10 cerdos.

3. Estudio de genotipado de cepas procedentes de cerdos

3.1. Cepas procedentes del total de cerdos.

En el estudio de Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes del total de aislados de *SARM*, se obtuvieron 12 patrones de bandas diferentes (A1 hasta A12) (Figura 4.1). Según los Criterios de Tenover, todos ellos pertenecen a un mismo pulsotipo (Pulsotipo A). Según su análisis por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), todos los subtipos pertenecen a un único clon: ST398. El análisis de agrupamiento de pulsotipos se muestra en el dendrograma (Figura 4.2).

Figura 4.1– Macrorrestricción con *Apal* y posterior PFGE. Peso molecular: carriles 1, 8 y 15. *SARM*: carriles 2–7 y 9–14.

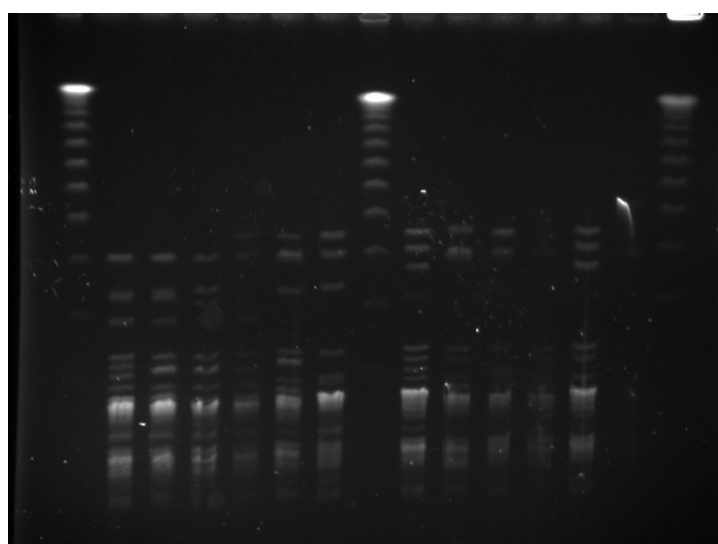
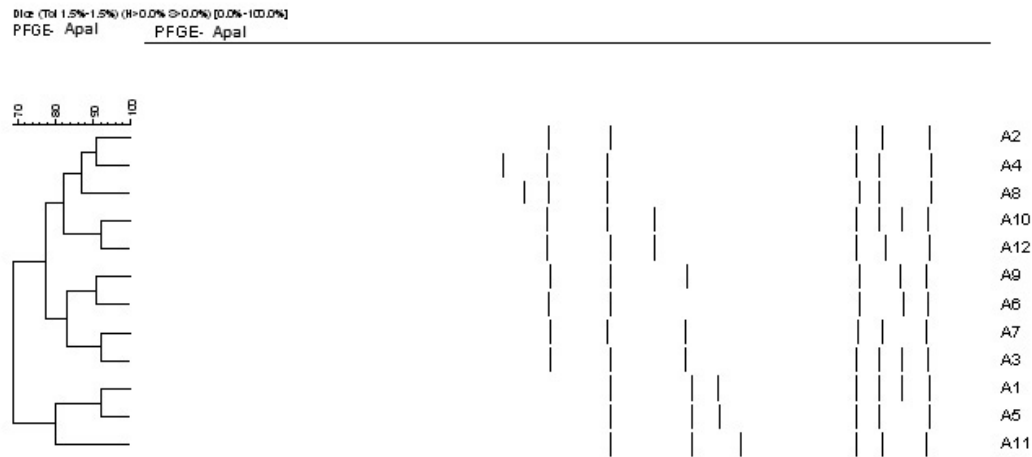


Figura 4.2-. Dendrograma de los patrones generados por *Apal*-PFGE de los aislamientos de *SARM*.

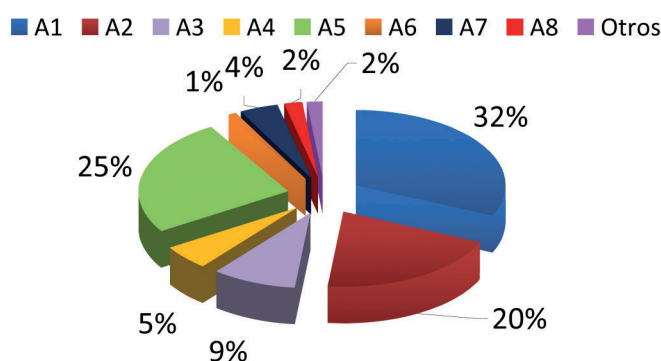
Al estudiar el cassette cromosómico estafilocócico, obtuvimos dos tipos diferentes, *SCCmec IV* en un 37% y el *SCCmec V* en un 63%.

La tabla 4.6 muestra los distintos patrones de bandas obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE), la frecuencia de aparición de los mismos y el tipo de Cassette Cromosómico Estafilocócico al cual pertenecen. Se observa que los patrones más frecuentes son el A1 y el A5, seguidos del patrón A2. La figura 4.3 muestra la distribución de los distintos patrones de bandas obtenidos.

Tabla 4.6- Distribución de las cepas aisladas de *SARM*, según patrón de banda y cassette cromosómico estafilocócico.

FUENTE	PFGE apal Subtipo	Número	<i>SCCmec</i>	MLST Sequence Type
Total de cepas aisladas de cerdos	A1	81	V	ST398
	A2	51	IV	ST398
	A3	24	IV	ST398
	A4	13	IV	ST398
	A5	65	V	ST398
	A6	2	IV	ST398
	A7	11	V	ST398
	A8	5	IV	ST398
	A9	1	V	ST398
	A10	1	V	ST398
	A11	1	V	ST398
	A12	1	V	ST398
TOTAL		256		

Figura 4.3– Distribución de los distintos patrones de bandas obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes con la enzima de macrorrestricción *Apal*.



3.2. Cepas procedentes de cerdos de cebo.

La tabla 4.7 muestra los distintos patrones de bandas obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes, la frecuencia de aparición de los mismos y el Cassette Cromosómico Estafilocócico que poseen. El *SCCmec* obtenido con más frecuencia fue el *SCCmec V*, como se observa en la figura 4.4. Los patrones de bandas más frecuentes son el A1 y el A5, seguidos del patrón A2 (Figura 4.5).

Figura 4.4– Distribución de las cepas de *SARM* según *SCCmec*.

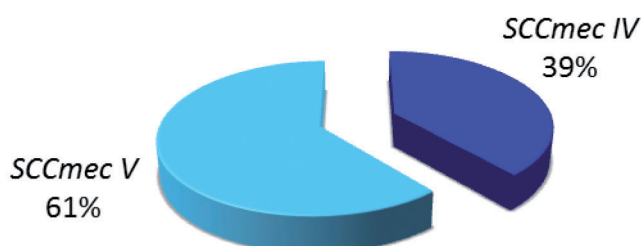
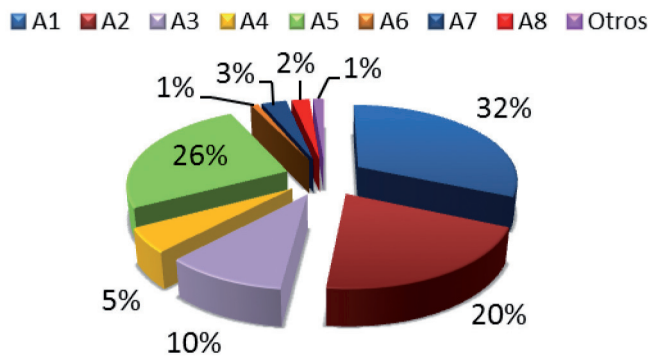


Tabla 4.7– Distribución del total de aislados de *SARM* cerdos de cebo según subtipo y *SCCmec*.

PFGE <i>Apal</i> Subtipo	NÚMERO	<i>SCCmec</i>	MLST Sequence Type
A1	74	V	ST398
A2	48	IV	ST398
A3	24	IV	ST398
A4	12	IV	ST398
A5	60	V	ST398
A6	2	IV	ST398
A7	7	V	ST398
A8	5	IV	ST398
A9	1	V	ST398
A11	1	V	ST398
A12	1	V	ST398

Figura 4.5– Distribución de los distintos patrones de bandas o subtipos obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes con la enzima de macrorrestricción *ApaI* en los *SARM* aislados en cerdos de cebo.



3.3. Lechones.

La tabla 4.8 muestra los distintos patrones de bandas obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes, la frecuencia de aparición de los mismos y el Cassette Cromosómico Estafilocócico que poseen. El *SCCmec* más frecuente sigue siendo el *SCCmec V* (figura 4.6).

A diferencia de los cerdos de cebo, en el caso de los lechones sólo se ven representados los patrones *A1*, *A2*, *A4*, *A5*, *A7* y *A10*. Este último sólo ha aparecido en los aislamientos de *SARM* de los lechones. Los patrones más frecuentes son el *A1* y el *A5*, a diferencia de los aislados de *SARM* en cerdos de cebo, donde el *A7* se encuentra muy representado (figura 4.7).

Tabla 4.8– Distribución del total de aislados de *SARM* lechones según subtipo y *SCCmec*.

PFGE <i>ApaI</i> Subtipo	NÚMERO	<i>SCCmec</i>	MLST Sequence Type
<i>A1</i>	7	V	ST398
<i>A2</i>	3	IV	ST398
<i>A4</i>	1	IV	ST398
<i>A5</i>	5	V	ST398
<i>A7</i>	4	V	ST398
<i>A10</i>	1	V	ST398

Figura 4.6– Distribución de los lechones aislados de *SARM* según *SCCmec*.

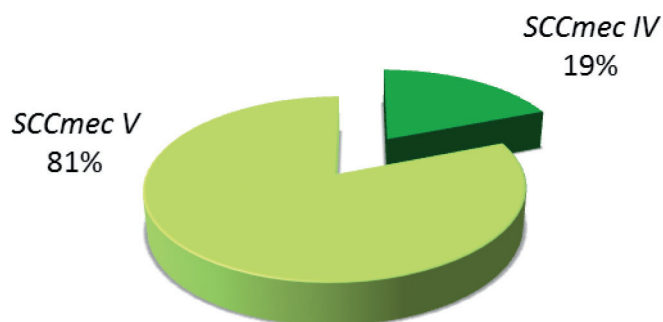
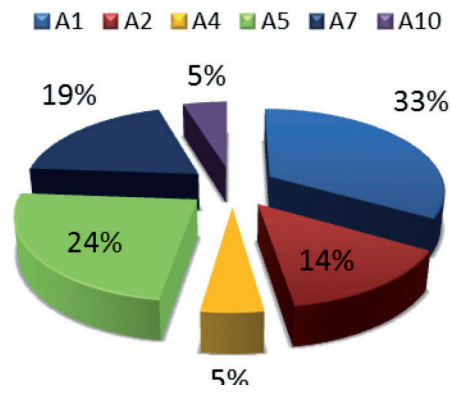


Figura 4.7– Distribución de los distintos patrones de bandas o subtipos obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes con la enzima de macrorrestricción *ApaI* en los *SARM* aislados en lechones.



4. Resistencia antibiótica de las cepas procedentes de cerdos

4.1. Total de muestras.

En la tabla 4.9 se observa el porcentaje de resistencia del total de cepas de *SARM* a los antibióticos ensayados. Las mayores resistencias, sin considerar los β -lactámicos, aparecen en clindamicina, aminoglucósidos y trimetoprima/sulfametoxazol (cotrimoxazol).

Tabla 4.9– Resistencia de las cepas de *SARM* a los antibióticos testados.

GRUPO FARMACOLÓGICO	ANTIBIÓTICO	% RESISTENCIA
β -lactámico	Bencilpenicilina	100
	Oxacilina	100
Aminoglucósidos	Gentamicina	38,3
	Tobramicina	39,4
Quinolonas	Levofloxacino	13,3
Macrólidos	Eritromicina	33,6
Lincosamidas	Clindamicina	50,4
Oxazolidinonas	Linezolid	0,0
Glicopéptido	Teicoplanina	0,0
	Vancomicina	0,0
Gliciliclinas	Tigeciclina	0,0
Fosfonatos	Fosfomicina	0,0
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	0,5
Bacteriostáticos	Ácido fusídico	0,0
	Trimetoprima*	38,7
Rifamicinas	Rifampicina	0,0
Sulfonamida	Sulfametoxazol*	38,7
Estreptograminas	Quinupristina/Dalfopristina	0,0
Ácido Pseudomónico	Mupirocina	0,0

* combinado como Trimetropin/Sulfametoxazol = Cotrimoxazol.

4.2. Resistencia a los antibióticos según SCCmec

En las figuras 4.8 y 4.9 se observa el porcentaje de resistencia de las cepas de SARM con respecto a los antibióticos aminoglucósidos, según tipo de Cassette Cromosómico Estafilocócico.

Figura 4.8– Resistencia a gentamicina según SCCmec.

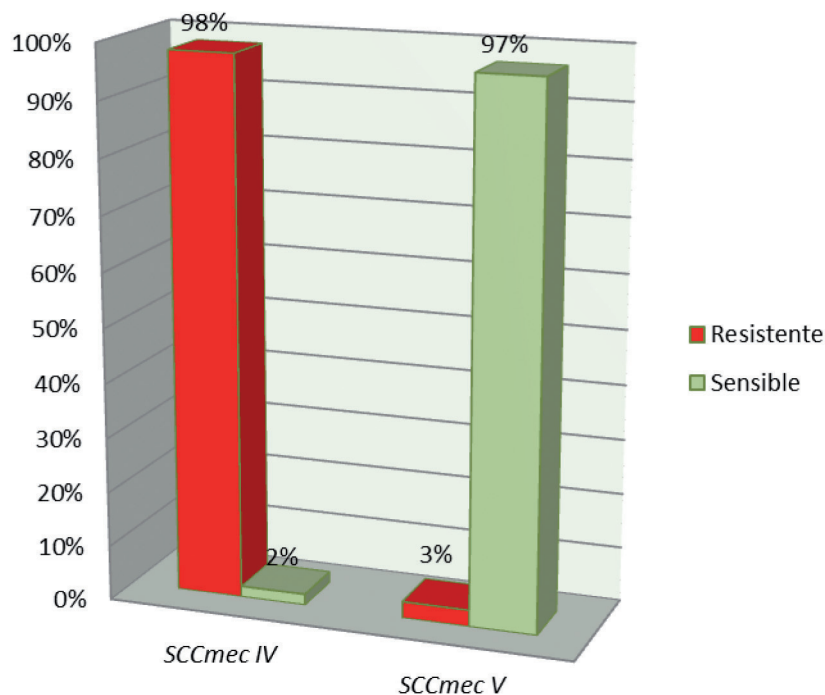
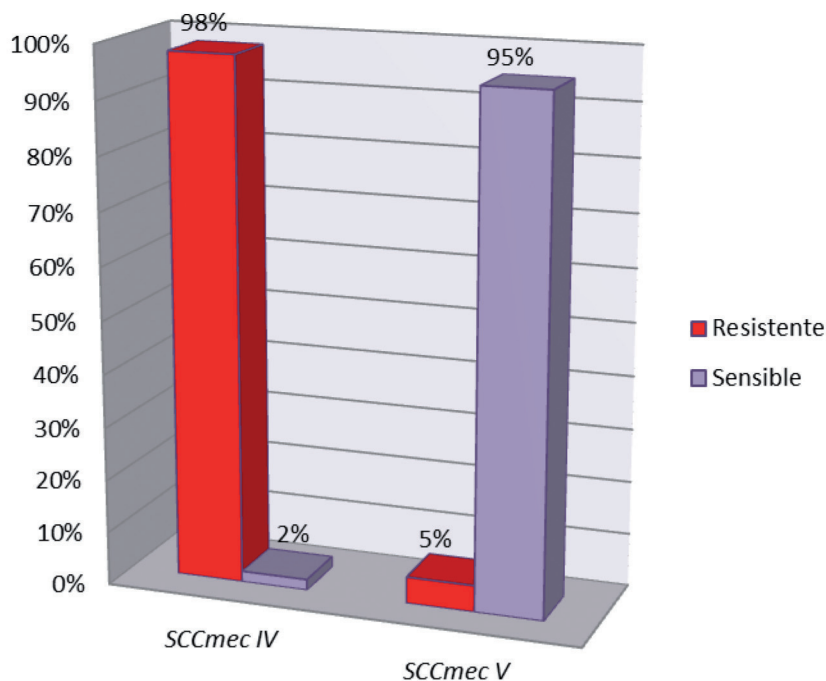


Figura 4.9– Resistencia a tobramicina según SCCmec.



Los aislados de SARM que tienen SCCmec IV presentan una resistencia mayor a la gentamicina y tobramicina que los que presentan el SCCmec V y esta diferencia es significativa ($p < 0,001$).

En las figuras 4.10, 4.11 y 4.12 se observa la susceptibilidad de los aislados de SARM, dependiendo del cassette cromosómico, para los antibióticos levofloxacino, eritromicina y cotrimoxazol. No existe diferencias significativas entre la susceptibilidad de los aislados testados según SCCmec a eritromicina, pero si en el caso de los antibióticos levofloxacino ($p < 0,001$), siendo más resistentes los que presentan el SCCmec V, a diferencia del caso de cotrimoxazol, donde son los que presentan SCCmec IV los más resistentes a este antibiótico ($p < 0,001$).

Figura 4.10– Resistencia a levofloxacino según SCCmec.

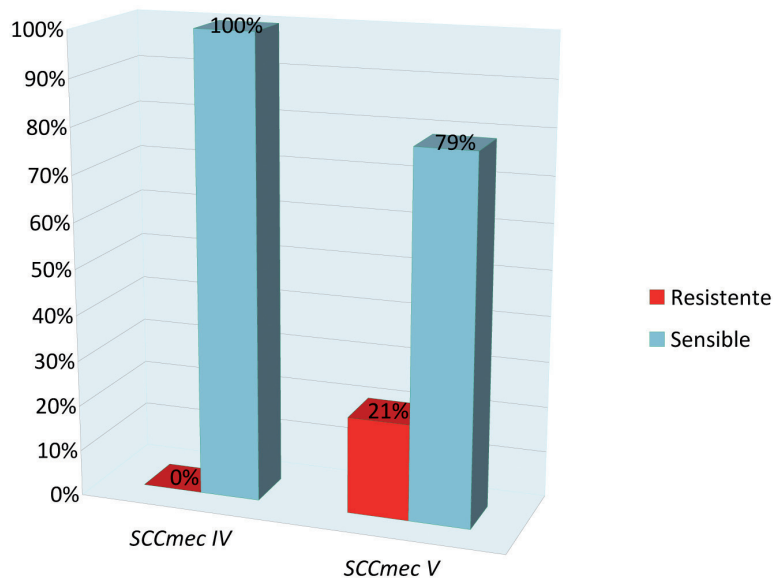


Fig 4.11– Resistencia a eritromicina según SCCmec

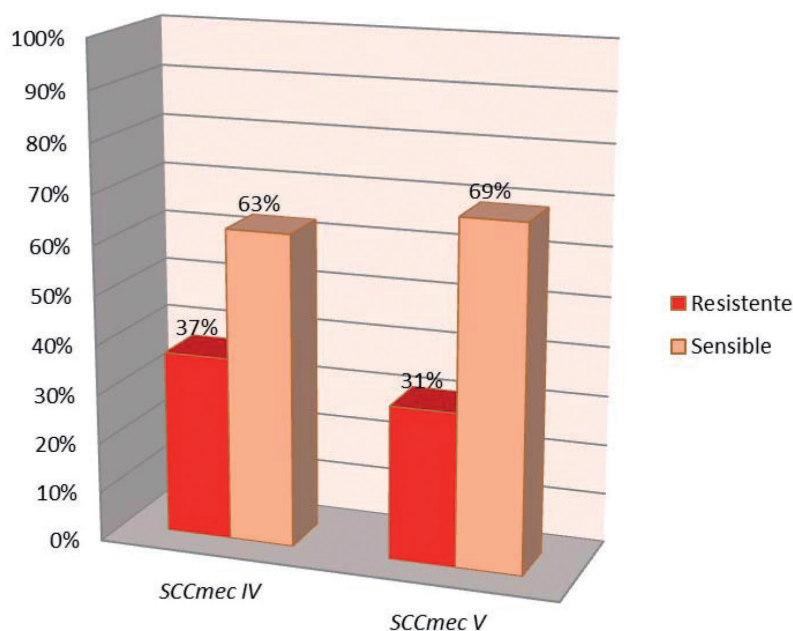
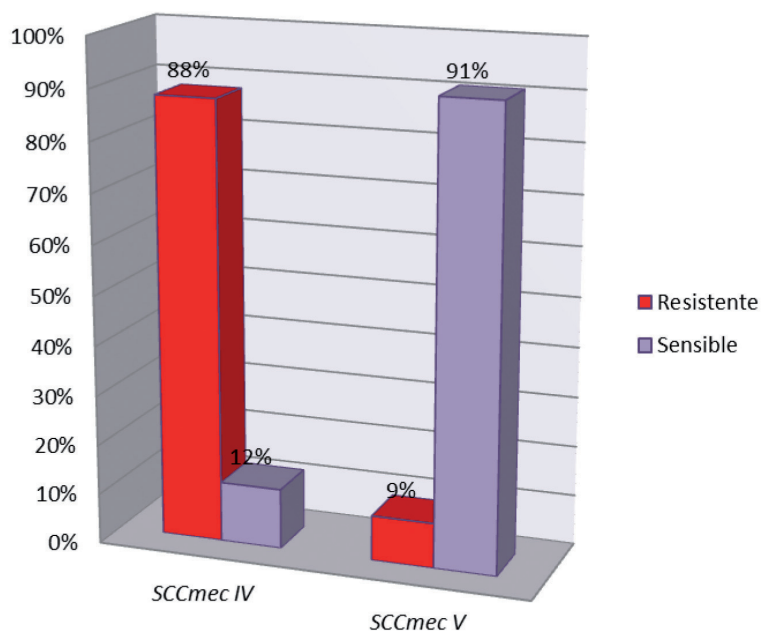


Figura 4.12– Resistencia a trimetropin/sulfomexazol (cotrimoxazol) según SCCmec.



4.3. Cerdos de cebo

Las resistencias a los distintos antibióticos testados de las cepas aisladas en cerdos de cebo se muestran en la tabla 4.10. Son resistentes a los β -lactámicos y para el resto de antibióticos la resistencia oscila entre el 0,3% a nitrofurantoína y el 47,6% a clindamicina.

Tabla 4.10– Resistencia antibiótica en los SARM aislados en cerdos de cebo.

Grupo Farmacológico	Antibiótico	% Resistencia
β -lactámico	Bencilpenicilina	100
	Oxacilina	100
Aminoglucósidos	Gentamicina	39,6
	Tobramicina	40,7
Quinolonas	Levofloxacino	12,2
Macrólidos	Eritromicina	30,1
Lincosamidas	Clindamicina	47,6
Oxazolidinonas	Linezolid	0,0
Glicopéptido	Teicoplanina	0,0
	Vancomicina	0,0
Glicilciclinas	Tigeciclina	0,0
Fosfonatos	Fosfomicina	0,0
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	0,3
Bacteriostáticos	Ácido fusídico	0,0
	Trimetoprima*	40,8
Rifamicinas	Rifampicina	0,0
Sulfonamida	Sulfametoxazol*	40,8
Estreptograminas	Quinupristina/Dalfopristina	0,0
Ácido Pseudomónico	Mupirocina	0,0

* combinado como Trimetoprima/Sulfametoxazol = Cotrimoxazol.

4.4. Lechones.

Las resistencias a los distintos antibióticos testados de los aislados de lechones se muestran en la tabla 4.11.

La resistencia a los β -lactámicos es del 100% y en el resto de valores la resistencia oscila entre el 4,8% a tobramicina hasta el 81% a clindamicina.

Tabla 4.11– Resistencia antibiótica en los *SARM* aislados en lechones.

GRUPO FARMACOLÓGICO	ANTIBIÓTICO	% RESISTENCIA
β -lactámico	Bencilpenicilina	100
	Oxacilina	100
Aminoglucósidos	Gentamicina	23,8
	Tobramicina	23,8
Quinolonas	Levofloxacino	23,8
Macrólido	Eritromicina	71
Lincosamidas	Clindamicina	81
Oxazolidinonas	Linezolid	0,0
Glicopéptido	Teicoplanina	0,0
	Vancomicina	0,0
Glicilciclinas	Tigeciclina	0,0
Fosfonatos	Fosfomicina	0,0
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	0,0
Bacteriostáticos	Ácido fusídico	0,0
	Trimetoprima*	14,28
Rifamicinas	Rifampicina	0,0
Sulfonamida	Sulfametoxazol*	14,28
Streptograminas	Quinupristina/Dalfopristina	0,0
Ácido Pseudomónico	Mupirocina	0,0

* combinado como Trimetoprima/Sulfametoxazol = cotrimoxazol.

5. Patrones de resistencia en el total de muestras

Se han obtenido un total de 20 patrones de resistencia antibiótica (tabla 4.11) y cuatro de ellos se han encontrado con mayor frecuencia, representando el 66% del total, como se observa en la (tabla 4.12).

Tabla 4.12– Patrones de resistencia.

PATRÓN DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
PG+OXA	50	19,5
PG+OXA+LVX	13	5,1
PG+OXA+GEN	1	0,4
PG+OXA+SXT	11	4,3
PG+OXA+CLIN	13	5,1
PG+OXA +TOB	1	0,4
PG+OXA +ERI+CLIN	44	17,2
PG+OXA +ERI+CLIN+ SXT	3	1,2
PG+OXA+GEN+TOB	8	3,12
PG+OXA+GEN+TOB+ SXT	41	16,0
PG+OXA+GEN+TOB +CLIN+ SXT	8	3,12
PG+OXA+GEN+TOB +ERI+CLIN+ SXT	34	13,3
PG+OXA+GEN+TOB+ERI+CLIN+FOS+ SXT	1	0,4
PG+OXA+ LVX +ERI+CLIN	1	0,4
PG+OXA + LVX +CLIN	19	7,42
PG+OXA+TOB+ LVX + SXT	2	0,8
PG+OXA+GEN+TOB +ERI+CLIN+NIT	1	0,4
PG+OXA+TOB+ERI+CLIN	1	0,4
PG+OXA+GEN+TOB+ERI+CLIN	1	0,4
PG+OXA+GEN+TOB +CLIN	3	1,2
Total	256	100,0

PG: Bencilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ERI: Eritromicina; CLIN: Clindamicina; FOS: Fosfomicina; NIT: Nitrofurantoina; LVX: Levofloxacin; SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol.

Si comparamos los patrones de resistencia más frecuentes de las cepas aisladas de cerdos, según *SCCmec*, se observa que existen diferencias significativas (tabla 4.13). Los patrones *bencilpenicilina/oxacilina* y *bencilpenicilina/oxacilina/eritromicina/clindamicina* aparecen con más frecuencia en las cepas que presentan el *SCCmec V* y los patrones *bencilpenicilina/oxacilina/gentamicina/tobramicina/cotrimoxazol* y *bencilpenicilina/oxacilina/gentamicina/tobramicina/eritromicina/clindamicina/cotrimoxazol* en las cepas que presentan el *SCCmec IV*.

Tabla 4.13– Patrones de resistencia antibiótica más frecuentes según *SCCmec*.

	<i>SCCmec</i>		
	Tipo IV	Tipo V	Total
PG + OXA	0 0,0%	50 52,6%	50 29,6%
PG + OXA + ERI + CLIN	0 0,0%	44 46,3%	44 26,0%
PG + OXA + GEN + TOB + SXT	41 55,4%	0 0,0%	41 24,3%
PG + OXA + GEN + TOB + ERI + CLIN + SXT	33 44,6%	1 1,1%	34 20,1%
TOTAL	74 100,0%	95 100,0%	169 100,0%

PG: Bencilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ERI: Eritromicina; CLIN: Clindamicina; FOS: Fosfomicina; NIT: Nitrofurantoína; LVX: Levofloxacin; SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol= Cotrimoxazol.

Tabla 4.14– Análisis Estadístico de los patrones de resistencia según *SCCmec*.

	VALOR	gl	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	165,057a	3	,000
Razón de verosimilitudes	222,645	3	,000
Asociación lineal por lineal	108,380	1	,000
N de casos válidos	169		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 14,89.

6. Aislamiento e identificación de *SARM* en trabajadores del sector porcino

6.1. Aislamiento de *SARM* en trabajadores del sector porcino

El porcentaje de aislamiento de *SARM* en muestras nasales de trabajadores fue del 9,3 (5/54). Todos pertenecían al sexo masculino y su media de edad fue de 40 ± 9.7 años. En la tabla 4.15 se observan las características de los trabajadores incluidos en el estudio, así como la distribución del porcentaje de positividad según las distintas variables. Las cinco muestras positivas se corresponden con 3 granjeros, 1 matarife y 1 veterinario. Todos habían estado en contacto con cerdos y el 60% (3/5) de los positivos había manipulado sangre u otros fluidos de los animales. El 80% (4/5) de los trabajadores positivos tuvieron contacto en su trabajo con más de 50 cerdos al día. Ninguno había ingresado en el hospital en los últimos doce meses, ni tenía infecciones o heridas en la piel de difícil curación.

Tabla 4.15. Prevalencia de *SARM* en trabajadores del sector, según variables estudiadas

VARIABLE		% POSITIVIDAD
OCUPACIÓN		
Veterinario	19	5,3 (1/19)
Auxiliar de Veterinario	2	0 (0/2)
Expedición de canales	1	0 (0/1)
Matarife	7	14,3 (1/7)
Limpieza matadero	1	0 (0/1)
Limpieza oficinas	1	0 (0/1)
Oficina	2	0 (0/2)
Operario de granja	17	17,5 (3/17)
Mantenimiento	1	0 (0/1)
Transportista del Matadero	3	0 (0/3)

→

→

NÚMERO DE CERDOS QUE MANIPULA AL DÍA		
0–50	17	5,9 (1/17)
51–100	11	9,1 (1/11)
101–200	17	11,8 (2/17)
> 201	9	11 (1/9)
MANIPULACIÓN DE SANGRE U OTROS FLUIDOS		
Si	20	15 (5/20)
No	34	0 (0/34)
INGRESO EN EL HOSPITAL EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES		
Si	8	0 (0/8)
No	46	10,9 (5/46)
INFECCIONES EN PIEL O HERIDAS QUE NO CURAN		
Si	4	0 (0/4)
No	50	10 (5/50)
EDAD		
18–30	14	7,1 (1/14)
31–45	25	12 (3/25)
46–56	16	6,2 (1/16)

6.2. Estudio de genotipado de las cepas aisladas en trabajadores del sector porcino.

La tabla 4.16 muestra los distintos subtipos obtenidos en la Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes, la frecuencia de aparición de los mismos y el Cassette Cromosómico Estafilocócico que poseen. El estudio de genotipado por Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes y posterior MLST muestran que todos pertenecen a un único pulsotipo (pulsotipo A), viéndose representados sólo cinco de los doce subtipos encontrados en cerdos (A1, A2, A3, A4 y A5). Todos ellos pertenecen a un solo clon: ST398, denominado actualmente a nivel internacional como “clon porcino”, ya que este animal actúa como reservorio del mismo.

Tabla 4.16– Distribución del total de aislados de *SARM* en trabajadores del sector porcino según subtipo y *SCCmec*.

SUBTIPO (<i>Apal</i>)	NÚMERO	<i>SCCmec</i>	MLST Sequence Type
A1	1	V	ST398
A2	1	IV	ST398
A3	1	IV	ST398
A4	1	IV	ST398
A5	1	V	ST398

6.3. Estudio de resistencia antibiótica en cepas aisladas en trabajadores del sector porcino.

Las resistencias a los distintos antibióticos testados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.17).

Estas cepas presentan resistencias, sin considerar los β -lactámicos, a gentamicina, tobramicina, levofloxacino, trimetoprima y sulfametoxazol. Al resto de antibióticos ensayados estas cepas presentan el 100% de sensibilidad.

Tabla 4.17– Resistencia antibiótica en los *SARM* aislados en trabajadores del sector.

GRUPO FARMACOLÓGICO	ANTIBIÓTICO	% RESISTENCIA
β -lactámico	Bencilpenicilina	100
	Oxacilina	100
Aminoglucósidos	Gentamicina	40
	Tobramicina	40
Quinolonas	Levofloxacino	20
Macrólido	Eritromicina	–
Lincosamidas	Clindamicina	40
Oxazolidinonas	Linezolid	–
Glicopéptido	Teicoplanina	–
	Vancomicina	–
Gliciliclinas	Tigeciclina	–
Fosfonatos	Fosfomicina	–
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	–
Bacteriostáticos	Ácido fusídico	–
	Trimetoprima*	40
Rifamicinas	Rifampicina	–
Sulfonamida	Sulfametoxazol*	40
Estreptograminas	Quinupristina/Dalfopristina	–
Ácido Pseudomónico	Mupirocina	–

* combinado como Trimetoprim/Sulfametoxazol = Cotrimoxazol.

6.4. Patrones de resistencia en los *SARM* aislados de trabajadores del sector porcino.

Se han obtenido 4 patrones de resistencia antibiótica que se muestran en la tabla 4.18.

Tabla 4.18– Patrones de resistencia antibiótica de los *SARM* aislados en trabajadores del sector porcino.

PATRÓN DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	NÚMERO
PG + OXA + LVX + CLIN	1
PG + OXA + GEN + TOB + CLIN + SXT	1
PG + OXA + GEN + TOB + SXT	1
PG + OXA	2

PG: Bencilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ERI: Eritromicina; CLIN: Clindamicina; FOS: Fosfomicina; NIT: Nitrofurantoína; LVX: Levofloxacino; SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol = Cotrimoxazol.

V. Discusión

1. Aislamiento de *SARM* en muestras nasales procedentes de cerdos

1.1. Prevalencia del aislamiento de *SARM* en cerdos.

Los resultados de nuestro estudio indican que los cerdos están altamente colonizados en su mucosa nasal por *SARM*, ya que la prevalencia es del 85,3%.

En todos los casos, si bien se tomó muestra nasal y rectal, los resultados presentados son siempre referidos a las muestras nasales, ya que en ningún caso la muestra rectal era positiva cuando la nasal era negativa. Por otra parte, los cultivos procedentes de las muestras nasales presentaban menor variedad de colonias, en la muestra rectal hay una mayor cantidad y variedad de colonias, lo que dificulta el aislamiento.

La primera colonización de *SARM* en cerdos fue comunicada en Holanda por Voss et al. (2005), que obtuvieron un porcentaje de colonización muy inferior al nuestro (0,35%), si bien eran pocas las muestras incluidas en su estudio.

Dada la importancia del tema en salud humana y animal, la *European Food Safety Authority* (EFSA) realizó el primer estudio a nivel de la Unión Europea sobre prevalencia de este microorganismo en las explotaciones porcinas. El estudio se llevó a cabo en 24 estados miembros, incluido España, y dos países extracomunitarios, durante el 2008. Se detectó este microorganismo en 17 países, entre ellos España, dando una prevalencia para nuestro país del 46% en explotaciones de reproducción de cerdos y el 51% para instalaciones de producción (EFSA, 2009).

Actualmente este microorganismo ha sido identificado en gran cantidad de países, principalmente de Europa y en América del Norte. En la tabla 5.1 se muestran la prevalencia

de colonización de cerdos por este microorganismo obtenida en los distintos estudios, el país de realización del mismo y el punto de muestreo de los animales. Como se observa, los distintos estudios obtienen gran diversidad de prevalencias, si bien en todos los casos inferiores a las nuestras y oscilan desde el 80% obtenido por Huijsdens et al. (2006) en cerdos de granjas de Holanda a estudios que no lo detectan, como el realizado por Horgan et al. (2010) en Irlanda.

Tabla 5.1– Prevalencia de colonización de cerdos por *SARM*.

REFERENCIA	PAÍS	N	PREVALENCIA	PUNTO DE MUESTREO
Huijsdens et al. (2006)	Holanda	10	80%	Granja
De Neeling et al. (2007)	Holanda	540	39% a 81%	Matadero
Guardabassi et al. (2007)	Dinamarca	100	10%	Granja
Khanna et al. (2008)	Canadá	285	25%	Granja
Van Duijkeren et al. (2008)	Holanda	310	11%	Granja
Meemken et al. (2008)	Alemania	678	13%	Granja
Wulf y Voss (2008a)	Holanda	–	39%	Matadero
Smith et al. (2009)	Estados Unidos	299	70%	Granja
Guardabassi et al., (2009)	Hong Kong	100	16%	Granja
Cui et al., (2009)	China	509	11,4%	Granja
Gómez-Sanz et al., (2010)	España	106	35%	Matadero
Broens et al. (2010)	Holanda	117	59,8%	Matadero
		117	0%	Granja
Huber et al. (2010)	Suiza	800	1,3%	Granja
Horgan et al. (2010)	Irlanda	440	0%	Matadero

Las muestras de nuestro estudio fueron recogidas en el Matadero Insular de Tenerife, que recibe los cerdos de todas las granjas de la Isla. Un estudio realizado en España, en 2 mataderos de La Rioja, en muestras nasales de cerdos y lechones, obtuvieron una prevalencia de colonización por *SARM* del 35%, inferior a la obtenida por nosotros (Gómez-Sanz et al., 2010). De Neeling et al. (2007) examinaron 540 cerdos de 9 mataderos de Holanda y encontraron que 209 (39%) eran portadores de *SARM* en sus fosas nasales, sugiriendo que este porcentaje que consideraron elevado, ya que es muy superior al indicado previamente también en Holanda por Voss et al. (2005), podría ser debido a la exposición de cerdos a este microorganismo en los establos y camiones de transporte de los animales de la granja al matadero.

Wulf y Voss, (2008a) en otro estudio también en Holanda, indican que el 39% de los cerdos del matadero eran positivos para *SARM*, afirmando que es necesario un esfuerzo para evitar una mayor propagación de esta cepa de *SARM*, por el importante problema de salud pública que pueden representar.

Broens et al. (2010), encuentran que la prevalencia de *SARM* en cerdos en mataderos en el momento del sacrificio era del (59,8%). La toma de la muestra la realizaron en diferentes momentos desde el origen en la granja hasta el momento del sacrificio en el matadero. Todos los cerdos estudiados eran negativos en la granja antes del transporte y a su llegada al matadero encontraron una positividad del 10,3%, relacionando este incremento con las condiciones del transporte. Así, después del transporte de los animales desde la granja al matadero y en la propia instalación, la colonización por *SARM* se incrementaba. Este incremento ocurría en el caso de los camiones de transporte que no eran debidamente desinfectados, ya que en muchas ocasiones la desinfección no era adecuada, ya que ésta dependía de factores como la carga bacteriana, el tipo de desinfectante, material del vehículo, tiempo de exposición al mismo, etc. Ya en el matadero, y en el caso de los corrales del matadero, a estas variables habría que añadir que el suelo normalmente era rugoso y dificultaba la eliminación de todos los microorganismos. Estos autores indican, que si bien los cerdos de distintas granjas suelen mantenerse separados, el contacto directo es posible, especialmente a través de las heces, por lo que, la transmisión de *SARM* entre los cerdos de las distintas granjas es posible. Los autores consideraron que este incremento en tan corto periodo de tiempo, de la granja al matadero, indicaba una muy rápida transmisión de este microorganismo.

Nosotros consideramos que las condiciones de transporte pueden influir, pero también las condiciones de la toma de muestra. En nuestro caso, realizamos la toma de la muestra en el matadero, cuando los cerdos permanecían inconscientes sin que el animal ofreciera resistencia alguna. En las granjas, pueden presentarse inconvenientes a la hora de inmovilizar al animal por la resistencia física que muestran a la introducción de la torunda. En nuestro estudio, al no existir grandes distancias entre las granjas y el matadero Insular, el tiempo de transporte, en todos los casos, fue inferior a las 2 horas. Por otra parte, en el matadero, permanecían menos de 24 horas, siempre separados en corrales según la granja de origen y siendo desinfectados los corrales entre los distintos lotes de cerdos mediante soluciones de hipoclorito sódico al 1ppm Cl_2 .

Horgan et al. (2010) realizaron un estudio de prevalencia en la industria porcina de Irlanda, tomando muestras en cerdos en 3 mataderos diferentes. De los 440 cerdos analizados, en ningún caso obtuvieron ningún aislamiento positivo para *SARM*.

Existen diversas publicaciones de prevalencia de *SARM* en cerdos de granja y con resultados dispares.

Van Duijkeren et al. (2008), también en Holanda, encontraron que un 11% de 310 cerdos estudiados eran positivos para *SARM*. Meemken et al., (2008) en Alemania encuentran un porcentaje de positividad del 13% (85/678) cuando estudiaron cerdos procedentes de 347 granjas diferentes. Huber et al. (2010) en un estudio realizado en Suiza concluyen que el *SARM*, y especialmente el ST398, ha entrado dentro de la cadena ganadera suiza.

Sin embargo, la prevalencia en su estudio es muy baja (1,3%), sugiriendo que el riesgo de transmisión desde el ganado al ser humano o a la comida de origen animal es limitado.

El *SARM*, como ya hemos visto se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, afectando no sólo a Europa, sino también al resto de continentes. En América, los primeros datos de prevalencia de *SARM* en Canadá fueron los aportados por Khanna et al., (2008) que encontraron una prevalencia del 25%, cuando estudiaron la colonización nasal de 285 cerdos en 20 granjas diferentes. Smith et al. (2009) en un estudio realizado en Iowa, Estados Unidos, encontraron una prevalencia de *SARM* elevada, donde 147 de 209 cerdos resultaron portadores de *SARM* (70%).

En Asia, los estudios de Guardabassi et al., (2009) en Hong Kong y Cui et al., (2009) en China, encontraron una prevalencia de *SARM* en cerdos del 16% y 11,4% respectivamente, en ambos casos en cerdos que eran muestreados en las granjas.

2. Aislamiento de *SARM* en cerdos según grupos de edad

Otro factor que parece estar implicado en la prevalencia de *SARM* asociado a los cerdos es la edad de los animales. En nuestro estudio se obtuvieron diferencias significativas según los dos grupos de edad estudiados ($p=0,031$), siendo el porcentaje de lechones positivos superior al de cerdo de cebo, de forma similar a lo obtenido en el estudio de Smith et al. (2009) que encontraron una tendencia de descenso significativo de la prevalencia de este microorganismo a medida que aumenta la edad de los animales, siendo los cerdos de 15 semanas o menos, los más colonizados en comparación con los adultos (OR: 2.17, 95% I.C.). En este mismo sentido, en España, Gómez-Sanz et al. (2010) que distinguen entre cerdos de cebo (53 muestras) y lechones (53 muestras) obtuvieron prevalencias del 21 y 49% respectivamente, indicando, como conclusión de su estudio, que es importante considerar la edad de los animales a la hora de diseñar y comparar los estudios, ya que existen diferencias de colonización según grupos de edad. Nosotros obtuvimos estas mismas diferencias, pero los porcentajes de colonización son muy superiores en nuestro estudio, alcanzando en lechones el 100% de positividad.

Sin embargo, en Canadá Khanna et al. (2008) estudiaron cerdos de tres grupos de edad, lechones lactantes (20% de positividad), destetados (28% de positividad) y cerdos de cebo (26% de positividad), no encontrando diferencias significativas de prevalencia entre los distintos grupos de edad.

Por el contrario, Weese et al. (2010) evaluaron la colonización por *SARM* en los lechones de forma longitudinal a lo largo de una serie de días, encontrando asociación significativa entre la edad de los cerdos y la probabilidad de la colonización. Ésta se incrementaba desde el 1% en lechones de 1 día, al 35% de positivos antes del destete y con un pico del 64% a la edad de 42 días. En el último día de muestreo (70 días) el 41% de los lechones eran portadores de *SARM*.

3.

Estudio de genotipado de *SARM* de muestras procedentes de cerdos

Todos los aislados de nuestro estudio pertenecen a un mismo clon, el ST398, que es el que mayoritariamente se asocia al ganado y en especial a la cabaña porcina y la referida por la mayoría de los autores consultados en sus estudios (Voss et al. 2005; Huijsdens et al. 2006; de Neeling et al. 2007; White et al. 2007, Wulf y Voss, 2008a; Van Belkum et al., 2008; Van Duijkeren et al. 2008; Lewis et al. 2008; Smith et al. 2009; Van den Broek et al., 2009; Huber et al., 2010).

Sin embargo, se han identificado otros clones de *SARM* procedentes de cerdos en diversos países. Armand–Lefevre et al. (2005) en un estudio realizado en Francia encontraron en 14 aislamientos de infecciones en cerdos, una gran diversidad de cepas de *SARM*, identificando los clones ST433, ST9, ST97, además del ST398.

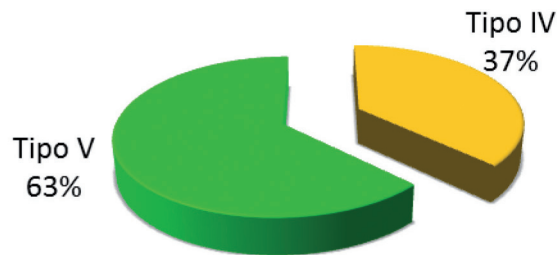
Khanna et al. (2008), en un estudio realizado en Canadá encontraron el ST398 y el ST5/USA100, colonizando las fosas nasales de los cerdos. Battisti et al. (2010) en Italia, encontraron las cepas ST398, ST9, ST97.

En España, Gómez–Sanz et al. (2010) en Logroño, encontraron en un estudio realizado en cerdos de distintos grupos de edad, recogidas en 2 mataderos de la Rioja, las cepas ST398 (en mayor proporción) y ST1379.

En Asia, existe un gran predominio de la cepa ST9. Así Guardabassi et al. (2009) en Hong Kong, encontraron una prevalencia del 16% (16/100) en cerdos y en todos los casos se identificó el ST9. Cui et al. (2009), también en este mismo país, encontraron esta misma cepa ST9 y en Malasia fue identificada por Neela et al. (2009).

Al estudiar los cassettes cromosómicos estafilocócicos de las cepas de *SARM* ST398 se obtuvieron dos tipos diferentes, *IV* y *V*, siendo el *SCCmec V* el predominante como se observa en la figura 5.1.

Figura 5.1– Distribución del total de los aislados de *SARM* según *SCCmec*.



Hasta el momento se han descrito 8 tipos de Cassette Cromosómico Estafilocócico, que son: *I, II, III, IV (IVa, IVb, IVc, IVd), V, VI, VII y VIII*. Los *SCCmec I, II, III, VI, VIII*, que son los cassettes más largos, se han asociado desde hace muchos años a cepas hospitalarias, sin embargo el *SARM* comunitario presenta normalmente los cassettes *IV, V, VII* (Malachowa y DeLeo, 2010).

La mayoría de los estudios describen para la cepa porcina ST 398 los *SCCmec III IV y V*. En nuestro estudio los encontrados son el *IV y V*, que coinciden con los de menor tamaño, como lo describen Vanderhaeghen et al. (2010). Éstos indican que estos cassettes al ser de menor tamaño confieren a la cepa mayor susceptibilidad antibiótica que las que presentan *SCCmec* mayores.

También en España, Gómez–Sanz et al. (2010) en su estudio realizado en cerdos de 2 mataderos de la Rioja, encuentran los *SCCmec IV, V*, de forma similar a los encontrados por nosotros y en el estudio de Witte et al. (2007) sobre aislamiento de *SARM* en animales de Centroeuropa, encuentra los cassettes cromosómicos *IV y V*, no sólo en cerdos, sino en caballos y perros. De forma similar también Van Duijkeren et al. 2008 en Holanda, encuentran los cassettes *IV, V* en *SARM* aislados de muestras nasales de cerdos.

De Neeling et al. (2007) estudiando aislados de *SARM* de cerdos de 9 mataderos de Holanda, encontraron los cassettes cromosómicos *III (3%), IV (39%) y V (57%)*, por tanto éste último es el mayoritario, de forma similar a nuestro estudio y al de Gómez–Sanz et al. (2010). También en Holanda, Van Belkum et al. (2008), encuentran en su estudio realizado en cerdos y humanos en Holanda, los cassette cromosómico *III, IV y V*.

Huber et al. (2010) en un estudio realizado en Suiza, aíslan de cerdos la cepa ST398, si bien en un bajo porcentaje (1,3%), encontrando en todos los casos, el cassette cromosómico *V*, de forma similar a lo encontrado por Smith et al. (2009) en Estados Unidos.

4. Resistencia antibiótica de las cepas procedentes de cerdos

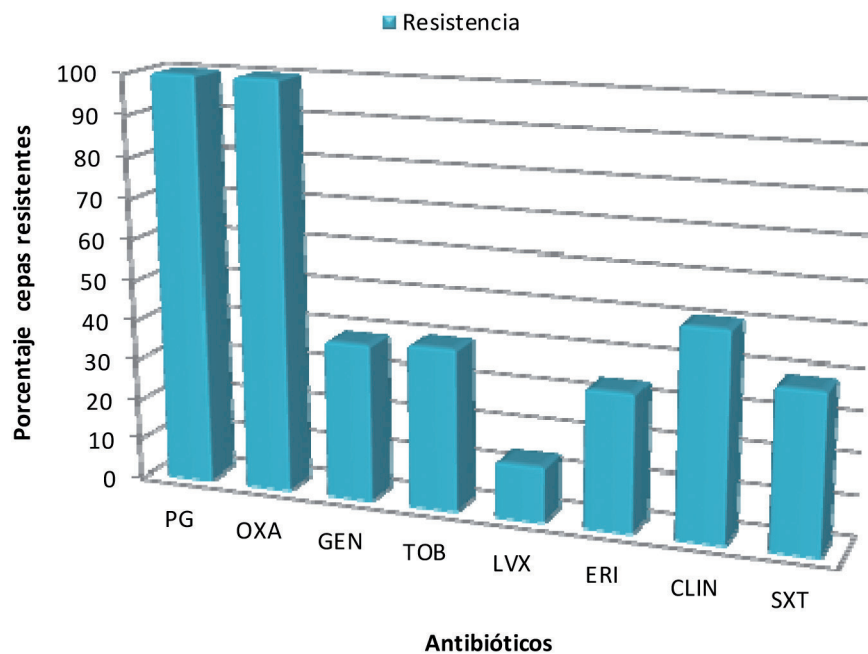
Los Cassettes Cromosómicos Estafilocócicos (*SCC*) codifican genes de resistencia a antibióticos y/o factores de virulencia. Considerando que muchos *SCCs* pueden codificar el gen de resistencia a la meticilina (*mecA*), los *SCCs* pueden ser clasificados en 2 grupos, *SCCmec* y *no-SCCmec*. Todas las cepas de *SARM* incluidos en nuestro estudio, que pertenecen a la cepa ST398 contienen el *SCCmec* que codifica el gen *mecA* y por tanto tienen resistencia a la meticilina y a todos los antibióticos β -lactámicos.

El problema de la aparición de microorganismos resistentes tales como el *SARM* asociado al ganado, está estrechamente relacionado con el mal empleo de los agentes antimicrobianos en veterinaria (de Neeling et al. 2007; Van den Broek, 2009). Las explotaciones porcinas intensivas en las que los animales se encuentran hacinados y estabulados, son más numerosas que las explotaciones expansivas, donde el animal se encuentra en libertad. La terapia preventiva o el tratamiento de animales sanos que conviven con otros enfermos pueden suponer un factor de riesgo para la aparición de estas cepas cuando se emplean subdosis, incluso en ocasiones como promotores de crecimiento a pesar de su prohibición, se prolonga demasiado el tratamiento o no se realiza un diagnóstico apropiado. Los cerdos incluidos en nuestro estudio provenían en todos los casos de granjas de producción intensiva, si bien no tuvimos acceso a los datos de uso de antimicrobiano en las mismas.

Un estudio realizado por Van Duijkeren et al., (2008) demostraron que el número de cerdos colonizados por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina era más alto en granjas que aplicaban tratamientos orales en sávana, comparado con las granjas que no lo hacían; sin embargo, otro estudio de Broens et al., (2010) no encontró tal asociación.

En nuestro estudio hemos encontrado elevados porcentajes de cepas de *SARM* resistentes a Clindamicina (50,4%) y a los aminoglucósidos, tobramicina (39,4%) y gentamicina (38,3%). También destacan los valores de resistencia obtenidos para los antibióticos cotrimoxazol (38,7%) y eritromicina (33,6%) como se observa en la figura 5.2.

Figura 5.2– Resistencia antimicrobiana de los aislados de *SARM*.



PG: Bencilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ERI: Eritromicina; CLIN: Clindamicina; LVX: Levofloxacino; SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol .

Existen diversos estudios que incluyen datos de susceptibilidad a distintos antibióticos de las cepas de *SARM* aislados de cerdos. Así, el 23% de los aislamientos de *SARM* del estudio de Neeling et al. (2007) presentaron resistencia conjunta a eritromicina y clindamicina, porcentaje que en nuestro estudio fue del 17%. En este mismo estudio indican que el 36% fueron resistentes a la kanamicina, gentamicina y tobramicina, porcentaje similar al obtenido por nosotros para los dos aminoglucósidos testados, gentamicina y tobramicina. Para el resto de los antibióticos encuentran el 100% de sensibilidad, sin embargo nosotros obtenemos un porcentaje elevado de resistencia al cotrimoxazol (38,7%), si bien inferior al 52% que obtienen Van Duijkeren et al. 2008, que afirman que la presión de la selección antimicrobiana es uno de los factores probables que han facilitado la emergencia y dispersión del *SARM* veterinario, siendo las tetraciclinas y el cotrimoxazol los más empleados y a los que estos microorganismos son más resistentes. En otro estudio holandés, Van den Broek et al. (2009) encuentran elevada resistencia a cotrimoxazol, eritromicina y clindamicina, superiores a las nuestras, siendo del 52% para los tres antibióticos.

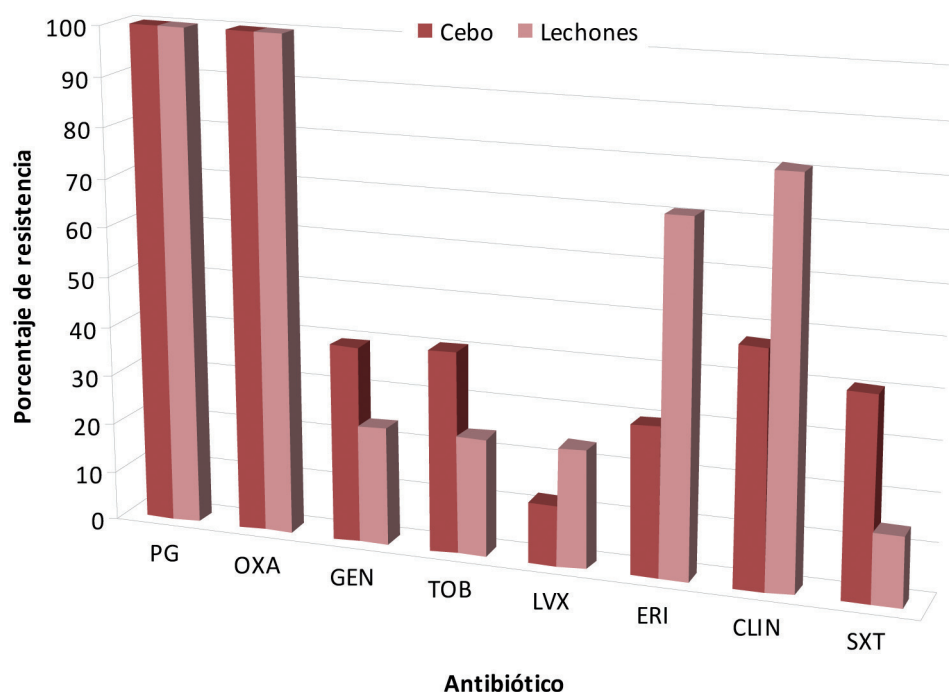
Smith et al. (2009), en un estudio de susceptibilidad de 15 aislados de *SARM* de cerdos encuentran que todos son sensibles a la mayoría de los antibióticos testados (cotrimoxazol,

levofloxacino, vancomicina, aminoglucósidos, etc.). Sin embargo, como hemos mencionado, nosotros hemos encontrado un porcentaje importante de cepas resistentes a cotrimoxazol, aminoglucósidos y levofloxacino. Estos autores dan porcentajes de resistencia a eritromicina menores que los nuestros (20%), sin embargo encuentran un porcentaje del 87% de cepas resistentes a clindamicina.

Battisti et al. (2010) encuentran altos porcentajes de resistencia al cotrimoxazol (68,8%) y eritromicina (60,9%), superiores a los obtenidos por nosotros.

En nuestro estudio, si comparamos las resistencias a los antibióticos de las cepas aisladas de lechones y cerdos de cebo, podemos ver, como los lechones son más resistentes a levofloxacino, eritromicina y clindamicina que los cerdos de cebo. Sin embargo las cepas de los lechones son más sensibles a los aminoglucósidos y cotrimoxazol (figura 5.3).

Figura 5.3– Comparación de la resistencia antimicrobiana de los *SARM* aislados de cerdos de cebo y de lechones.



PG: Bencilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ERI: Eritromicina; CLIN: Clindamicina; LVX: Levofloxacino; SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol .

El único estudio que hemos encontrado sobre la diferencia de susceptibilidad de las cepas de los cerdos según grupos de edad, es el de Gómez–Sanz et al. (2010), que indican que todas las cepas mostraron resistencia a los β -lactámicos y tetraciclina, y para el resto de los antibióticos obtuvieron diferentes perfiles de resistencia, que eran dependientes del grupo de edad. Así los cerdos de cebo eran más resistentes a la tobramicina y cotrimoxazol que los lechones, de forma similar a los datos obtenidos por nosotros.

Si comparamos el Cassette Cromosómico Estafilocócico *IV* y *V* con la resistencia a los antibióticos, se observan diferencias significativas para los antibióticos gentamicina, tobramicina, levofloxacino y trimetoprima/sulfametoxazol.

Los aislados de *SARM* que tienen *SCCmec* tipo *IV* presenta una mayor resistencia a la gentamicina, tobramicina y cotrimoxazol que los que presentan el *SCCmec* tipo *V* y esta diferencia es significativa ($p < 0,000$). Sin embargo, en el caso del levofloxacino la resistencia es predominante en las cepas que presentan el *SCCmec* *V* ($p=0,000$). En el estudio realizado por Gómez-Sanz et al. (2010) en Logroño, en cerdos en el matadero, detectan que las cepas con *SCCmec* *IV* presentan una mayor resistencia a la gentamicina y tobramicina que las que poseen *SCCmec* *V*, de forma similar a lo obtenido por nosotros.

El patrón de multiresistencia más común en nuestro estudio, definiéndolo como resistencia a más de 3 antibióticos, fue el que incluía los β -lactámicos junto a eritromicina y clindamicina, que aparece en un 17,2% de los aislados de *SARM*. El 23% de los aislamientos de *SARM* del estudio de Neeling et al. (2007) presenta esta misma multiresistencia. Otros estudios también mencionan esta misma resistencia conjunta (Witte et al. 2007; Kadlec et al., 2009; Battisti et al. 2010; Mulders et al., 2010; Gómez-Sanz et al., 2010).

Nosotros obtuvimos que los patrones de multiresistencia que incluyen más antibióticos se dan en los aislados de *SARM* que presentan el *SCCmec* *IV* y esta diferencia es significativa ($p=0,000$), de forma similar a lo encontrado en el estudio de Gómez-Sanz et al. (2010). Éstos indican que el genotipo de multiresistencia está generalmente asociado a la presencia del *SCCmec* *IV*. Así en nuestro estudio los patrones *bencilpenicilina/oxacilina* y *bencilpenicilina/oxacilina/eritromicina/clindamicina* aparecen con más frecuencia en las cepas que presentan el *SCCmec* tipo *V* ($p=0,000$) y los patrones *bencilpenicilina/oxacilina/gentamicina/tobramicina/cotrimoxazol* y *bencilpenicilina/oxacilina/gentamicina/tobramicina/eritromicina/clindamicina/cotrimoxazol* en las cepas que presentan el *SCCmec* tipo *IV* y estas diferencias son significativas ($p=0,000$).

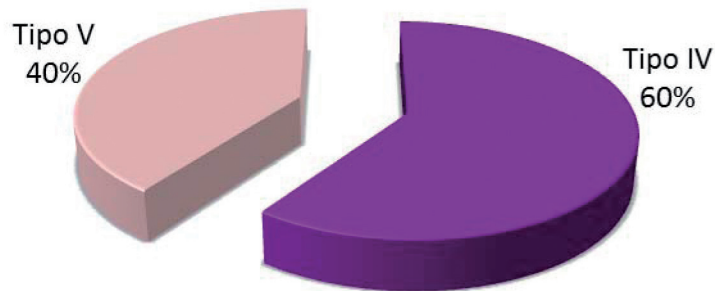
5. Aislamiento, identificación y tipificación de las *SARM* procedentes de trabajadores del sector porcino

En el mismo período de tiempo en que realizamos en el Matadero Insular de Tenerife el muestreo de los cerdos para la detección de este microorganismo, se recogieron exudados nasales de trabajadores del matadero y de distintas granjas, que dieron su conformidad para ser incluidos en el estudio. Los trabajadores de las granjas pertenecían a las mismas granjas de los cerdos muestreados en el matadero.

El porcentaje de positividad de trabajadores del sector porcino fue del 9,3% (5/54). Del estudio de los datos epidemiológicos obtenidos de la breve encuesta cumplimentada por cada trabajador sobre sus características personales, profesionales y sanitarias, podemos indicar que todas las cepas de *SARM* fueron aisladas de personal que trabajaba en contacto directo con cerdos, el 80 % (4/5) tuvieron contacto en su trabajo con más de 50 cerdos al día. Estos datos concuerdan con lo mencionado en un estudio realizado en Alemania por Meemken et al. (2008) donde concluyen que existe una fuerte asociación entre la intensidad de contacto con los cerdos y la frecuencia de colonización nasal en los trabajadores. Sin embargo, destacar que nosotros obtuvimos un porcentaje inferior a la mayoría de los estudios, a pesar de la elevada prevalencia obtenida en cerdos.

El porcentaje de veterinarios portadores de *SARM* (5,3%, 1/19) que obtuvimos fue inferior al de los operarios de granja (17,5%, 3/17). El 60% de los positivos había manipulado sangre de los cerdos. En ningún caso tenían heridas ni habían estado ingresados recientemente en un hospital.

En todos los casos la cepa encontrada era la de origen porcino ST398 y los cassettes cromosómicos eran el IV y el V (figura 5.4), coincidiendo con los encontrados en las muestras de origen porcino, si bien el IV fue el mayoritario a diferencia de los cerdos que se encontró en mayor frecuencia el V.

Figura 5.4– Distribución de los portadores aislados de *SARM* según *SCCmec*.

Existen publicados en los últimos años diversos estudios sobre la presencia de *SARM* en trabajadores en contacto con cerdos, siendo en la mayoría de ellos la prevalencia de portadores nasales de *SARM* superiores a la encontrada por nosotros (tabla 5.2). Sin embargo, como ya hemos mencionado la prevalencia de *SARM* en cerdos de nuestro estudio es la más elevada de todos los estudios consultados.

Voss et al. (2005) demostraron por primera vez la transmisión de *SARM* entre cerdos, granjeros y miembros de su familia y entre una enfermera que vivía cerca de una granja porcina y un paciente en el Hospital. En todos los casos la cepa aislada era la cepa porcina ST398. Como conclusión de su estudio afirmaron que la tasa de prevalencia de *SARM* en trabajadores del sector porcino era 760 veces superior que la tasa de los pacientes ingresados en los hospitales holandeses.

Armand–Lefevre et al. (2005) en un estudio casos y control realizado en Francia, encontraron un mayor riesgo de los granjeros y personal en contacto con cerdos de ser colonizados por *SARM* que el resto de la población, obteniendo una gran diversidad de cepas en trabajadores del sector porcino y grupos control, siendo encontrados solo en granjeros las cepas ST398, ST8, ST9.

Tabla 5.2– Diferentes estudios sobre aislamiento de *SARM* en humanos.

REFERENCIA	PAÍS	N	PREVALENCIA	POBLACIÓN
Voss et al. (2005)	Holanda	26	23%	Granjeros
		10.000	0,003%	Población general
Huijsdens et al., 2006	Holanda	–	–	Granjero y familia
Khanna et al. (2008)	Canadá	25	20%	Granjeros
Wulf et al. (2008 c)	Holanda	272	12,5%	Veterinarios
Meemken et al., (2008)	Alemania	86	23%	Trabajadores del sector
Smith et al. (2009)	Estados Unidos	20	45%	Trabajadores del sector

→

→

Cuny et al., (2009)	Alemania	113	86%	Granjeros
		116	4%	Familiares de granjeros
		18	86%	Veterinarios
		44	4%	Familiares de veterinarios
Dennis et al. (2009)	Bélgica	127	37,8%	Trabajadores del sector
Van den Broek et al. (2009)	Holanda	50	30%	Granjeros
Huber et al. (2010)	Suiza	133	3%	Veterinarios
		148	0%	Granjeros
		179	0%	Empleados de matadero
Horgan et al. (2010)	Irlanda	100	2%	Trabajadores del sector
Van Cleef et al. (2010b)	Holanda	534	0,2%	Población general
		49	26,5%	Granjeros y trabajadores
Van Cleef et al. (2010a)	Holanda	249	5,6%	Empleados del Matadero
Van Cleef et al. (2011)	Holanda	40	17%	Trabajadores del sector

Huijsdens et al. (2006) en su estudio realizado en Holanda, demostraron la clara diseminación y transmisión de *SARM* entre cerdos y humanos, donde una mujer, esposa de un granjero, presentó mastitis por *SARM* y posteriormente su hija contrajo una infección por pneumococcus que necesitó ingreso y a los 5 días le aislaron *SARM*. Cuando se hizo el estudio se comprobó que tanto la hija como en la madre eran portadoras de la cepa ST398, coincidiendo con la que se aisló posteriormente en un estudio realizado en los cerdos de la granja de su propiedad.

Khanna et al. (2008) en Canadá encuentran una prevalencia de *SARM* del 20% en trabajadores de granjas porcinas, indicando una correlación entre la presencia de este microorganismo en las granjas, tanto en cerdos como en humanos ($p=0,00025$). Igual que en nuestro estudio todos habían estado en contacto con animales y ninguno de los positivos tenía historia reciente de hospitalización, ni presentaban heridas o infecciones en la piel.

Wulf et al. (2008c), con ocasión de una convención internacional en Dinamarca de veterinarios de varios países (todos ellos con frecuente contacto con cerdos), recogieron 272 exudados nasales, encontrando una prevalencia de portadores de *SARM* del 12,5%, valor similar al nuestro. Dentro de los veterinarios participaron 11 españoles, de los que 2 resultaron positivos (18%). Encontraron relación entre la colonización nasal por este microorganismo con la frecuencia de contacto con los cerdos (OR 16,3, IC 3,75–70,6). En todos los casos la cepa se identificó como ST398, indicando que la transmisión de *SARM* de cerdos al personal que trabaja con ellos, veterinarios, granjeros, etc. es un problema internacional de salud pública, debido a la creación de un nuevo reservorio para *SARM* comunitario en humanos de Europa y probablemente a nivel mundial.

Meemken et al. (2008) en Alemania encuentran un 23% de colonizados cuando estudiaron 86 personas con exposición ocupacional a cerdos (veterinarios, personal laboratorio e inspectores sanitarios) y en todos los casos se identificó la cepa ST398. En el mismo país, Cuny et al. (2009) estudiaron 113 muestras nasales de granjeros en contacto con granjas colonizadas por *SARM* y lo compararon con 116 miembros de su familia que no estaban en contacto con cerdos, encontrando que el 86% de los granjeros eran positivos para este microorganismo frente al 4% de los miembros de su familia. En el mismo estudio incluyeron 18 veterinarios que atendían cerdos y 44 familiares no expuestos, encontrando un porcentaje de colonización del 86% y 4% respectivamente.

Smith et al. (2009) en su estudio realizado en USA para detectar *SARM* en trabajadores del sector porcino, encontraron una prevalencia del 45% (9/20), muy superior al obtenido por nosotros. Ellos afirman que la alta dispersión de este microorganismo, puede ser causada por la selección de cepas resistentes por la elevada utilización de antibióticos en las granjas de cerdos.

Van den Broek et al. (2009) estudiaron 231 personas incluyendo granjeros, familiares y trabajadores, resultando 33 de ellas portadoras de *SARM* (14,3%) y concretamente la cepa ST398. Determinaron que los trabajadores positivos pertenecían a las granjas cuyos cerdos habían dado positivos para este microorganismo, indicando que a mayor proporción de muestras de cerdos positivos para *SARM*, mayor tasa de positividad en personas, concluyendo que trabajar en granjas con cerdos positivos para este microorganismo representa un riesgo elevado de ser colonizado por el mismo. Estos autores también señalan que aquellas personas que tomaron las muestras del estudio, tanto de cerdos como de trabajadores y que se incluyeron a su vez en el estudio, resultaron positivas tras una exposición breve durante la toma de la muestra, negativizándose la mayoría de ellas en las 48 horas posteriores a la recogida de la muestra. A estas mismas conclusiones llegan Van Cleef et al. (2011) en su estudio sobre la prevalencia y duración de la colonización de 199 personas con una corta exposición a cerdos y ganado (sin exposición previa), encontrando que el 17% adquirieron *SARM*, siendo negativas a las 24 horas en el 94% de los casos.

Denis et al. (2009), en 50 granjas de Bélgica, encontraron que el 37,8% de los trabajadores eran portadores de *SARM* ST398, siendo esta prevalencia mayor que la encontrada en pacientes hospitalizados en Bélgica, indicando la importancia de la realización de nuevos trabajos para estudiar las posibles rutas de transmisión de cerdos a humanos, incluyendo la ruta aérea y el contacto con superficies contaminadas.

Huber et al. (2010) realizaron en Suiza un amplio estudio de detección de *SARM* en 148 granjeros en contacto con cerdos y 133 veterinarios, encontrando que todos los granjeros eran negativos para *SARM* y solo 4 veterinarios eran positivos para este microorganismo. Las cepas aisladas pertenecían al ST398 y ST8.

En Irlanda Horgan et al. (2011) realizaron un amplio estudio para detectar *SARM* en cerdos y trabajadores en contacto con los mismos, no aislándolo de cerdos y sólo en el 2% de los trabajadores (2/100), siendo la cepa aislada ST398.

En trabajadores de matadero, destaca el estudio de Van Cleef et al., (2010a), que indican una prevalencia en trabajadores de mataderos de Holanda del 5.6%, donde trabajar con cerdos vivos resultó ser el factor más relevante para la colonización por *SARM*. También estudiaron muestras ambientales de mataderos a lo largo de la jornada, encontrando la presencia de *SARM* en una alta prevalencia y relacionándola con la presencia de esta cepa en el ambiente del matadero en las zonas con mayor contaminación (desangrado, escaldado, depilación, etc.). Estos mismos autores (Van Cleef et al., 2010b) indican en otro estudio sobre la prevalencia de esta cepa en 583 personas que vivían en comunidades con alta densidad de cerdos, que la prevalencia de *SARM* de los que no tenían contacto directo con cerdos era del 0,2% y que se incrementaba al 26,5% en aquellas personas que trabajaban o vivían en una granja.

En diversos países, el *SARM* ST398 ha causado infecciones en humanos incluyendo endocarditis (Ekkelenkamp et al. 2006), neumonía asociada a ventilación (Witte et al. 2007) e infecciones de heridas (Huidsjens et al. 2006).

Wulf et al. (2008b), en Holanda describen el primer brote de un *SARM* ST398 en un quirófano de un hospital holandés, demostrando que la transmisión hospitalaria de esta cepa porcina. Cuando investigaron una infección en una úlcera de un pie diabético de un paciente de quirófano, encontraron 9 casos más de infección y /o colonización en el hospital, incluyendo 4 pacientes y 5 trabajadores del hospital. Uno de los trabajadores vivía cerca de una granja, pero manifestó no haber tenido contacto con los cerdos y no se investigó en la granja, ya que no se obtuvo autorización.

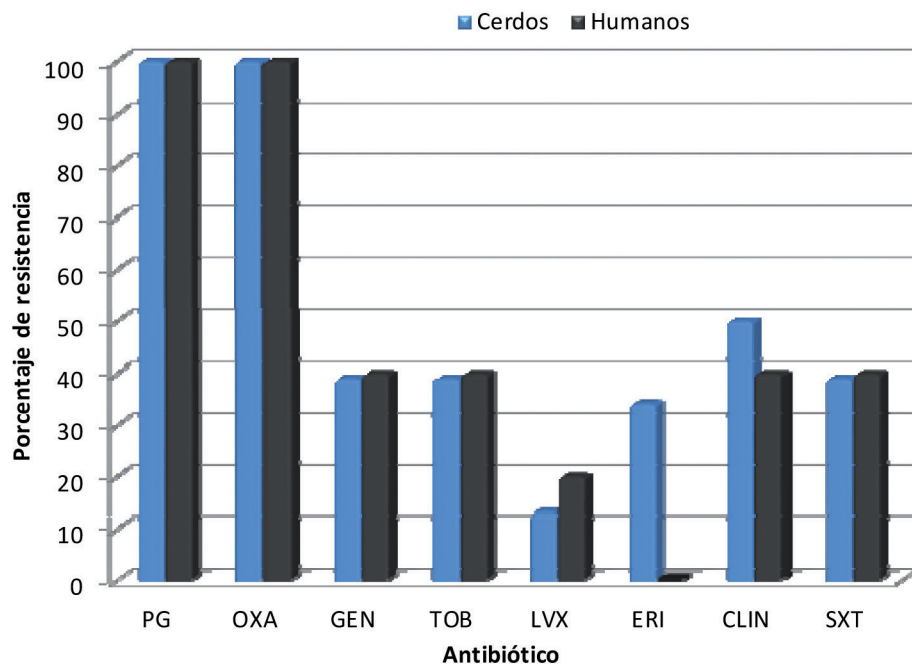
Montesinos et al., 2011 publicaron un estudio sobre prevalencia de *SARM* en el Hospital Universitario de Canarias, indicando la detección mediante un programa de vigilancia activa de portadores de *SARM* de 2 casos de la cepa porcina ST398, siendo en un caso una persona que trabajaba con cerdos y en el otro no se llegaron a localizar sus antecedentes laborales. Previamente, Potel et al. (2010) publicaron el primer aislado humano de la cepa ST398 en España.

Un reciente estudio de Schijffelen et al. (2010) analizan el genoma de una cepa de ST398 SCC-*mec* Tipo V, aislado en un caso de endocarditis humana en un hospital holandés. Ellos indican que el hecho de que hasta ahora aislamientos de *SARM* ST398 no han causado enfermedad invasiva frecuentes en el ser humano, puede ser debido a la ausencia de varios factores de virulencia comunes en otras cepas de *SARM*. Sin embargo, la cepa ST398 presenta una alta capacidad para adquirir elementos móviles, lo que puede llevar a la rápida adquisición de los factores que contribuyen a la virulencia en las infecciones humanas.

6. Resistencia a los antibióticos de *SARM* aislados en trabajadores del sector porcino

Si analizamos la resistencia antibiótica de las 5 cepas aisladas de los trabajadores se observa que aparecen resistencias a los antibióticos similares a las que aparecen en las cepas aisladas de *SARM* en cerdos, a excepción de la eritromicina, ya que todas las cepas aisladas de trabajadores son sensibles a este antibiótico (figura 5.5). No se pudo realizar el tratamiento estadístico de estos datos debido al escaso número de aislamientos en personal del sector porcino.

Figura 5.5– Comparación de las resistencias antibióticas de los aislados de *SARM* de trabajadores y cerdos.



PG: Bencilpenicilina; OXA: Oxacilina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ERI: Eritromicina; CLIN: Clindamicina; LVX: Levofloxacino; SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol.

Wulf et al. (2008c) aislaron SARM en 34 veterinarios de un total de 272 que acudieron a una convención en Holanda. Tras los análisis de sensibilidad antibiótica el 58% de los aislados presentaron resistencia a cinco o más clases de antibióticos, asociándolo con el consumo de antibióticos por parte del ganado. Así encontraron en este estudio cepas con elevada resistencia a la tetraciclina (70%), al cotrimoxazol (48%) y a la gentamicina (20%). También indican 4/31 aislados resistentes a la ciprofloxacina correspondiendo a dos veterinarios de Italia y otros dos de España.

Smith et al. 2009, indicaron que ninguno de los 9 aislados de SARM ST398 en humanos fue resistente a la eritromicina o quinupristin–dalfopristin, pero 1 (11%) fue resistente a la clindamicina.

Cui et al. (2009) aislaron cepas de SARM, en este caso la ST9 con SCCmec IV, encontrando que todos los aislados fueron resistentes a cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina y tetraciclina y encontraron dos perfiles de multirresistencia predominantes: *ciprofloxacina/clindamicina/eritromicina/cefoxitina/gentamicina/tetraciclina/chloramphenicol/ciprofloxacina/clindamicina/eritromicina/cefoxitina/gentamicina/tetraciclina* y todos fueron susceptibles a *linezolid, nitrofurantoina, teicoplanina, cotrimoxazol y vancomicina*.

En nuestros cinco aislados los patrones de multirresistencia encontrados, aparte de la referida a oxacilina y bencilpenicilina (2 cepas) los patrones *bencilpenicilina/oxacilina/levofloxacino/clindamicina* (1 cepa), *bencilpenicilina/oxacilina/gentamicina/tobramicina/clindamicina/cotrimoxazol* (1 cepa) y *bencilpenicilina/oxacilina/gentamicina/tobramicina/cotrimoxazol* (1 cepa).

Van den Broek et al. (2009), comparan prevalencia de SARM en población con y sin contacto con cerdos, indican que todos los SARM ST398 aislados en humanos presentan alta resistencia al cotrimoxazol, eritromicina, clindamicina, (52% en todos los casos) y superior a lo obtenido por nosotros. A los aminoglucósidos presentan 23% de resistencia a la tobramicina y 15% a la gentamicina, inferior al obtenido por nosotros.

VI. Conclusiones

1.

La prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en la cabaña porcina de Tenerife es elevada y superior a los datos referidos en los distintos estudios consultados, siendo significativamente mayor en los lechones que en los cerdos de cebo. No existen diferencias según el tamaño de la granja de procedencia de los cerdos.

2.

Consideramos que la recogida de las muestras nasales de los cerdos en el matadero en el momento del sacrificio cuando están inconscientes presenta ventajas con relación a la toma in vivo en las granjas, ya que no tiene los inconvenientes de inmovilizar y vencer la resistencia del animal, si bien, como indican otros autores, el transporte y permanencia en el matadero podría incrementar el riesgo de colonización por este microorganismo.

3.

Se ha obtenido un único pulsotipo y doce subtipos, perteneciendo todos ellos a un mismo clon, el ST398, que es el que mayoritariamente se asocia al ganado y en especial a la cabaña porcina y la referida por la mayoría de los autores.

4.

Al estudiar los cassettes cromosómicos estafilocócicos obtuvimos dos tipos diferentes, el *SCCmec IV* y *SCCmec V*, siendo este último el predominante.

5.

Hemos encontrado elevados porcentajes de aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina que son resistentes a clindamicina, a los aminoglucósidos tobramicina y gentamicina, a eritromicina, levofloxacino y cotrimoxazol.

6.

Los aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina que presentan *SCCmec* tipo IV tienen una mayor resistencia a la gentamicina, tobramicina y cotrimoxazol que los que presentan el *SCCmec* tipo V y esta diferencia es significativa. Sin embargo, en el caso del levofloxacino la resistencia es predominante en las cepas que presentan el *SCCmec* V.

7.

El patrón de multirresistencia más común en las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina es el que incluye los β -lactámicos junto a eritromicina y clindamicina. Los patrones de multirresistencia que contienen más antibióticos se dan en los aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina que presentan el *SCCmec* IV y esta diferencia con respecto a los de *SCCmec* V es significativa.

8.

El porcentaje de trabajadores del sector porcino portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina es del 9,3%, inferior a lo esperado dada la elevada prevalencia encontrada en cerdos. El clon encontrado es el ST398, y los cassettes cromosómicos estafilocócicos obtenidos son el *SCCmec* IV y V, coincidiendo con las muestras de origen porcino.

9.

Todos los portadores nasales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina trabajaban con cerdos diariamente y ninguno tenía infecciones o lesiones en la piel de difícil curación ni habían estado ingresados en un Hospital en los últimos doce meses.

10.

Al valorar la resistencia antibiótica de las cepas aisladas de los trabajadores se observa que aparecen resistencias similares a las encontradas en las cepas aisladas en cerdos.



Bibliografía



- Alves PD, McCulloch JA, Even S, Le Maréchal C, Thierry A, Grosset N.** *Molecular characterisation of Staphylococcus aureus strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity.* *Vet Microbiol.* 2009; 137:190–5.
- Arias CA, Vallejo M, Reyes J, Panesso D, Moreno J, Castañeda E, et al.** *Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the cfr gene encoding a 23S rRNA methyltransferase.* *J Clin Microbiol.* 2008. 46(3):892–6.
- Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andreumont A.** *Clonal comparison of Staphylococcus aureus isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs.* *Merg Infect Dis.* 2005. May; 11(5):711–4.
- Asensio A, Cantón R, Vaqué J, Rosselló J, Calbo F, García-Caballero J et al.** *Nosocomial and community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in hospitalized patients (Spain, 1993–2003).* *J Hosp Infect.* 2006. Aug; 63(4):465–71. Epub 2006 Jun 15.
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, et al.** *Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.* *Lancet.* 2002. 359(9320):1791–2.
- Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE, Jensen VF, Guardabassi L.** *Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin- and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals.* *Vet Microbiol.* 2007. Apr 15; 121(3–4):307–15.
- Barber M.** *Methicillin-resistant Staphylococci.* *J Clin Pathol.* 1961. 14:385.
- Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R** *Heterogeneity among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italian pig finishing holdings.* *Vet Microbiol.* 2010. May 19; 142(3–4):361–6.
- Bens CC, Voss A, Klaassen CH.** *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.* 2006. May; 44(5):1875–6.
- Berger-Bächi B, Rohrer S.** *Factors influencing methicillin resistance in staphylococci.* *Arch Microbiol.* 2002. Sep; 178(3):165–71.
- Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, Hiramatsu K.** *Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain isolated in Sweden.* *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. 52(10):3512–6.
- Boyce JM.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Detection, epidemiology, and control measures.* *Infect Dis Clin North Am.* 1989. Dec; 3(4):901–13.
- Boyce JM.** *Strategies for controlling methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitals.* *J Chemother.* 1995. Jul; 7 Suppl 3:81–5.
- Boyle-Vavra S, Daum RS.** *Reliability of the BD GeneOhm methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) assay in detecting MRSA isolates with a variety of genotypes from the United States and Taiwan.* *J Clin Microbiol.* 2010. Dec; 48(12):4546–51.
- Broens EM, Graat EA, van der Wolf PJ, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Wagenaar JA et al.** *MRSA CC398 in the pig production chain.* *Prev Vet Med.* 2010. Feb 1; 98(2–3):182–9.
- Chambers HF.** *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* *Emerg Infect Dis.* 2001. Mar–Apr; 7(2):178–82.
- Chihara S, Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B.** *Staphylococcus aureus bacteriuria as a prognosticator for outcome of Staphylococcus aureus bacteremia: a case-control study.* *BMC Infect Dis.* 2010. 10:225.
- Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y.** *The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges.* *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005. 26(2):166–74.

- Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y.** Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003. Jan 1; 36(1):53–9.
- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, et al.** *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986–2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008. 26(5):269–77.
- Cui S, Li J, Hu C, Jin S, Li F, Guo Y et al.** Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J Antimicrob Chemother*. 2009. Oct; 64(4):680–3.
- Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nübel U, Ohlsen K et al.** Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol*. 2010. Feb; 300(2–3):109–17.
- Dancer SJ.** Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infect Dis*. 2008. Feb; 8(2):101–13. Epub 2007 Oct 31.
- David MZ, Mennella C, Mansour M, Boyle–Vavra S, Daum RS.** Predominance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pathogens causing skin and soft tissue infections in a large urban jail: risk factors and recurrence rates. *J Clin Microbiol*. 2008. Oct; 46(10):3222–7.
- De Jonge R, Verdier JE, Havelaar AH.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst professional meat handlers in the Netherlands, March–July 2008. *Euro Surveill*. 2010. pág. Nov 18; 15(46).
- De Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen–Verheuel MG, Dam–Deisz WD, Boshuizen HC et al.** High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol*. 2007. Jun 21; 122(3–4):366–72.
- Denis O, Suetens C, Hallin M, Catry B, Ramboer I, Dispas M et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis*. 2009. Jul; 15(7):1098–101.
- Deurenberg RH, Stobberingh EE.** The evolution of *Staphylococcus aureus*. *The evolution of Staphylococcus aureus*. 2008. 8(6):747–63.
- Devriese LA, Hommez J.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res Vet Sci*. 1975. Jul; 19(1):23–7.
- Devriese LA, Van Damme LR, Fameree L.** Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1972. Aug; 19(7):598–605.
- Diekema DJ, Climo M.** Preventing MRSA infections: finding it is not enough. *JAMA*. 2008. Mar 12; 299(10):1190–2.
- EARSS.** European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report. 2007.
- EARSS.** European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report. 2008.
- EFSA.** Analysis of the baseline survey on the prevalence of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. *EFSA Journal*. 2009. pág. 7(11):1376.
- Ekkelenkamp MB.** Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2006. Nov 4; 150(44):2442–7.
- Ellis MW, Griffith ME, Jorgensen JH, Hospenthal DR, Mende K, Patterson JE.** Presence and Molecular Epidemiology of Virulence Factors in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing and Infecting Soldiers. *J Clin Microbiol*. 2009. April; 47(4): 940–945.
- Ellis MW, Hospenthal DR, Dooley DP, Gray PJ, Murray CK.** Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. *Clin Infect Dis*. 2004. 39(7):971–9.
- Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL et al.** Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis*. 2003. Mar 1; 36(5):592–8.

- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG.** *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. May 28; 99(11):7687–92.
- EPINE** *Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España.* 2009.
- Faires MC, Traverse M, Tater KC, Pearl DL, Weese JS.** *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus infections in dogs.* Emerg Infect Dis. 2010. Jan; 16(1):69–75.
- Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H.** *Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococcus aureus strains.* J Clin Microbiol. 2008. 46(1):136–44.
- Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R et al.** *Epidemiology of emerging methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection.* J Clin Microbiol. 2005. Apr; 43(4):1836–42.
- Fontanilla JM, Kirkland KB, Talbot EA, Powell KE, Schwartzman JD, Goering RV et al.** *Outbreak of skin infections in college football team members due to an unusual strain of community-acquired methicillin-susceptible Staphylococcus aureus.* J Clin Microbiol. 2010. Feb; 48(2):609–11. Epub 2009 Dec 9.
- Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA et al.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in three communities.* N Engl J Med. 2005. 352(14):1436–44.
- Fridkin SK, Lawton R, Edwards JR, Tenover FC, McGowan JE Jr, Gaynes RP et al.** *Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci.* Emerg Infect Dis. 2002. 8(7):702–7.
- Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F et al.** *Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups.* Foodborne Pathog Dis. 2010. Oct; 7(10):1269–77.
- Gordon RJ, Lowy FD.** *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection.* Clin Infect Dis. 2008. Jun 1; 46 Suppl 5:S350–9.
- Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW.** *Geographic Distribution of Staphylococcus aureus Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis.* PLoS Med. 2010. pág. 12; 7(1):e1000215.
- Guardabassi L, O'Donoghue M, Moodley A, Ho J, Boost M.** *Novel lineage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Hong Kong.* Emerg Infect Dis. 2009. Dec; 15(12):1998–2000.
- Guardabassi L, Stegger M, Skov R.** *Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus ST398 in Danish slaughter pigs.* Vet Microbiol. 2007. Jun 21; 122(3–4):384–6.
- Haddadin AS, Fappiano SA, Lipsett PA.** *Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the intensive care unit.* Postgrad Med J. 2002. Jul; 78(921):385–92.
- Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S et al.** *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children with no identified predisposing risk.* JAMA. 1998. Feb 25; 279(8):593–8.
- Higuchi W, Takano T, Teng LJ, Yamamoto T.** *Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII.* Biochem Biophys Res Commun. 2008. 19; 377(3):752–6.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T.** *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Trends Microbiol. 2001. 486–93.

- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility.* J Antimicrob Chemother. 1997. Jul; 40(1):135–6.
- Hope R, Livermore DM, Brick G, Lillie M, Reynolds R.** *Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06.* J Antimicrob Chemother. 2008. Nov; 62 Suppl 2:ii65–74.
- Horgan M, Abbott Y, Lawlor PG, Rossney A, Coffey A, Fitzgerald GF.** *A study of the prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs and in personnel involved in the pig industry in Ireland.* Vet J. 2010. pág. Dec 29.
- Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C.** *Prevalence and characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009.* Euro Surveill. 2010. pág. Apr 22; 15(16). pii: 19542.
- Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheue MG, Heck ME, Pluister GN et al.** *Community-acquired MRSA and pig-farming.* Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006. pág. Nov 10; 5:26.
- Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K.** *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC.* Antimicrob Agents Chemother. 2004. 48(7):2637–51.
- Ito Y, Morita E, Moriyama M, Kuono H, Tanaka K, Kato N, Watanabe K.** *Evaluation of MRSA identification with latex agglutination kit for the detection of penicillin-binding protein 2.* Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 2001. 12(1):9–13.
- Johnson AP, Aucklen HM, Cavendish S, Ganner M, Wale MC, Warner M et al.** *Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS).* J Antimicrob Chemother. 2001. Jul; 48(1):143–4.
- Johnson PD, Martin R, Burrell LJ, Grabsch EA, Kirsas SW, O’Keeffe J et al.** *Efficacy of an alcohol/chlorhexidine hand hygiene program in a hospital with high rates of nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection.* Med J Aust. 2005. Nov 21; 183(10):509–14.
- Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J et al.** *Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine.* J Antimicrob Chemother. 2009. Dec; 64(6):1156–64.
- Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS.** *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers.* Vet Microbiol. 2008. Apr 30; 128(3–4):298–303.
- Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G et al.** *Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001–2002.* J Infect Dis. 2006. 193(2):172–9.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al.** *Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet. 2001. 357(9264):1225–40.
- Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørum M et al.** *Pigs as source of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 infections in humans, Denmark.* Emerg Infect Dis. 2008. Sep; 14(9):1383–9.
- Lin J, Yeh KS, Liu HT, Lin JH.** *Staphylococcus aureus isolated from pork and chicken carcasses in Taiwan: prevalence and antimicrobial susceptibility.* J Food Prot. 2009. Mar; 72(3):608–11.
- Lowy FD.** *Staphylococcus aureus infections.* N Engl J Med. 1998. 339:520–3.
- Lozano C, López M, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C, Zarazaga M.** *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in food samples of animal origin in Spain.* J Antimicrob Chemother. 2009. Dec; 64(6):1325–6. Epub 2009 Oct 21.
- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS et al.** *Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains.* Antimicrob Agents Chemother. 2002. 46(4):1147–52.

- Madaras–Kelly KJ, Remington RE, Lewis PG, Stevens DL.** *Evaluation of an intervention designed to decrease the rate of nosocomial methicillin–resistant Staphylococcus aureus infection by encouraging decreased fluoroquinolone use.* Infect Control Hosp Epidemiol. 2006. 27(2):155–69.
- Malachowa N, DeLeo FR.** *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus.* Cell Mol Life Sci. 2010. Sep; 67(18):3057–71. Review.
- Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Eds.** *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica.* Churchill Livingstone. Philadelphia. Elsevier, 2006. Vol. Sexta Edición.
- Maranan.** Antimicrobial resistance in staphylococci. *Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance.* Infect Dis Clin North Am. 1997. Dec; 11(4):813–49.
- Maree CL, Eells SJ, Tan J, Bancroft EA, Malek M, Harawa NT et al.** *Risk factors for infection and colonization with community–associated methicillin–resistant Staphylococcus aureus in the Los Angeles County jail: a case–control study.* Clin Infect Dis. 2010. Dec 1; 51(11):1248–57. Epub 2010 Oct 29.
- Meemken D, Cuny C, Witte W, Eichler U, Staudt R, Blaha T.** *Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production–preliminary results of a study in the northwest of Germany.* Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2008. Apr; 115(4):132–9.
- Monnet DL, MacKenzie FM, López–Lozano JM, Beyaert A, Camacho M, Wilson R et al.** *Antimicrobial drug use and methicillin–resistant Staphylococcus aureus, Aberdeen, 1996–2000.* Emerg Infect Dis. 2004. Aug; 10(8):1432–41.
- Montesinos I, Castro B, Lecuona M, Sierra A.** *Molecular epidemiology of methicillin–resistant Staphylococcus aureus in a Spanish hospital: low prevalence of community and animal–associated clones.* J Hosp Infect. 2011. 77:362–363.
- Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra.** *A Epidemiologic genotyping of methicillin–resistant Staphylococcus aureus by pulsed–field gel electrophoresis at a University hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gen polymorphisms.* J. Clin. Microbiol. 40,2119–2125. 2002. 40,2119–2125.
- Mulders MN, Haenen AP, Geenen PL, Vesseur PC, Poldervaart ES, Bosch T et al.** *Prevalence of livestock–associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands.* Epidemiol Infect. 2010. May; 138(5):743–55.
- Muller A, Thouverez M, Talon D, Bertrand X.** *[Contribution of antibiotic pressure in the acquisition of methicillin–resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a university hospital].* Pathol Biol (Paris). 2003. Oct; 51(8–9):454–9.
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM et al.** *SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug–resistant strains of Staphylococcus aureus and enterococcus.* Infect Control Hosp Epidemiol. 2003. May; 24(5):362–86.
- Nahimana I, Francioli P, Blanc DS.** *Evaluation of three chromogenic media (MRSA–ID, MRSA–Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin–resistant Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Infect. 2006. 12(12):1168–74.
- Neela V, Mohd Zafrul A, Mariana NS, van Belkum A, Liew YK, Rad EG.** *Prevalence of ST9 methicillin–resistant Staphylococcus aureus among pigs and pig handlers in Malaysia.* J Clin Microbiol. 2009. Dec; 47(12):4138–40.
- Nemati M, Hermans K, Lipinska U, Denis O, Deplano A, Struelens M et al.** *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock–associated methicillin–resistant strain ST398.* Antimicrob Agents Chemother. 2008. Oct; 52(10):3817–9.
- Nguyen DM, Mascola L, Brancroft E.** *Recurring methicillin–resistant Staphylococcus aureus infections in a football team.* Emerg Infect Dis. 2005. 11(4):526–32.
- Oie S, Kamiya A.** *Survival of methicillin–resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on naturally contaminated dry mops.* J Hosp Infect. 1996. 34(2):145–9.

- Oliveira DC, Milheiro C, Vinga S, de Lencastre H.** *Assessment of allelic variation in the ccrAB locus in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones.* J Antimicrob Chemother. 2006. 58(1):23–30.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H.** *The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements.* Microb Drug Resist. 2001. 7(4):349–61.
- Otter JA, French GL.** *Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe.* Lancet Infect Dis. 2010. Apr; 10(4):227–39.
- Pathak A, Marothi Y, Iyer RV, Singh B, Sharma M, Eriksson B et al.** *Nasal Carriage and Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus aureus in healthy preschool children in Ujjain, India.* BMC Pediatr. 2010. pág. Dec 29; 10:100.
- Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Ferraro MJ, et al.** *Linezolid resistance in Staphylococcus aureus: characterization and stability of resistant phenotype.* J Infect Dis. 2002. 186(11):1603–7.
- Potel C, Alvarez-Fernández M, Constenla L, Alvarez P, Perez S.** *First human isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus sequence type 398 in Spain.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010. Mar; 29(3):351–2.
- Pu S, Han F, Ge B.** *Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Louisiana retail meats.* Appl Environ Microbiol. 2009. Jan; 75(1):265–7. Epub 2008 Oct 31.
- Pujol M, Peña C, Pallares R, Ariza J, Ayats J, Dominguez MA et al.** *Nosocomial Staphylococcus aureus bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains.* Am J Med. 1996. 100(5):509–16.
- Pujol M, Peña C, Pallares R, Ayats J, Ariza J, Gudiol F.** *Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994. Jan; 13(1):96–102.
- Rasschaert G, Vanderhaeghen W, Dewaele I, Janez N, Huijsdens X, Butaye P et al.** *Comparison of Fingerprinting Methods for Typing Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Sequence Type 398.* J Clin Microbiol. 2009. October; 47(10): 3313–3322.
- Robinson DA, Enright MC.** *Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother. 2003. Dec; 47(12):3926–34.
- Rodríguez-Baño J, Angeles Domínguez M, Blas Millán A, Borraz C, Pau González M, Almirante B, et al.** *Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Spain.* Clin Microbiol Infect. 2009. 15(12):1111–8.
- Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Todi SK, Gomez DY et al.** *International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003–2008, issued June 2009.* Am J Infect Control. 2010. Mar; 38(2):95–104.e2.
- Schijffelen MJ, Boel CH, van Strijp JA, Fluit AC.** *Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolate from a case of human endocarditis.* BMC Genomics. 2010. pág. Jun 14; 11:376.
- Schwartz D.C.** *Separation of yeast chromosome sized ADNs by pulsed-field gradient gel electrophoresis.* Cell. 1984. 37:67–75.
- Sergio DM, Koh TH, Hsu LY, Ogden BE, Goh AL, Chow PK.** *Investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs used for research.* J Med Microbiol. 2007. Aug; 56(Pt 8):1107–9.
- Sexton T, Clarke P, O'Neill E, Dillane T, Humphreys H.** *Environmental reservoirs of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene.* J Hosp Infect. 2006. 62(2):187–94.
- Shitrit P, Gottesman BS, Katzir M, Kilman A, Ben-Nissan Y, Chowers M.** *Active surveillance for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) decreases the incidence of MRSA bacteremia.* Infect Control Hosp Epidemiol. 2006. 27(10):1004–8.

- Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED et al.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers.* PLoS One. 2009. pág. 4(1):e4258.
- Sopena N, Sabrià M.** *Methicillin resistant Staphylococcus aureus.* Med Clin (Barc). 2002. 118(17):671–6.
- Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E.** *Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant Staphylococcus aureus screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs.* Clin Microbiol Infect. 2009. 15(2):112–9.
- Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF.** *Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among Staphylococcus aureus: 2005 status in the United States.* Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006. pág. Feb 9; 5:2.
- Sztramko R, Katz K, Antoniou T, Mulvey M, Brunetta J, Crouzat F et al.** *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in men who have sex with men: A case series.* Can J Infect Dis Med Microbiol. 2007. July; 18(4): 257–261.
- Tenover F.C.** *Interpreting Chromosomal ADN restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.* Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal ADN restrij Clin Microbiol. 1995. 33: 2233–22.
- Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV.** *Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus.* Emerg Infect Dis. 2001. Mar–Apr; 7(2):327–32.
- Tenover FC, Pearson ML.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Emerg Infect Dis. 2004. 10(11):2052–3.
- Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP.** *Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Ann Intern Med. 1982. Sep; 97(3):309–17.
- van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, van Leeuwen WB, van Duijkeren E, Huijsdens XW et al.** *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus sequence type 398 in pigs and humans.* Emerg Infect Dis. 2008. Mar; 14(3):479–83.
- van Cleef BA, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Züchner L, Van Benthem BH et al.** *High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands.* Epidemiol Infect. 2010. May; 138(5):756–63.
- van Cleef BA, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Züchner L, Van Benthem BH et al.** *High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands.* Epidemiol Infect. 2010. May; 138(5):756–63.
- van Cleef BA, Monnet DL, Voss A, Krziwanek K, Allerberger F, Struelens M et al.** *Livestock-associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Humans, Europe.* Emerg Infect Dis. 2011. 17(3):502–505.
- van Cleef BA, Verkade EJ, Wulf MW, Buiting AG, Voss A, Huijsdens XW et al.** *Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in The Netherlands.* PLoS One. 2010. Feb 25; 5(2):e9385.
- van den Broek IV, van Cleef BA, Haenen A, Broens EM, van der Wolf PJ, van den Broek MJ.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in people living and working in pig farms.* Epidemiol Infect. 2009. May; 137(5):700–8.
- van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ et al.** *Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms.* Veterinary Microbiology. 2008. Volume 126, Issue 4, 25 January 2008, Pages 383–389.
- van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D et al.** *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans.* Emerg Infect Dis. 2007. Dec; 13(12):1834–9.
- van Loo IH, Diederer BM, Savelkoul PH, Woudenberg JH, Roosendaal R, van Belkum A et al.** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands.* Emerg Infect Dis. 2007. Nov; 13(11):1753–5.

- van Rijen MM, Van Keulen PH, Kluytmans JA.** Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clin Infect Dis.* 2008. Jan 15; 46(2):261–3.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H et al.** Community–Acquired Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying *Panton–Valentine Leukocidin* Genes: Worldwide Emergence. *Emerg Infect Dis.* 2003. Aug; 9(8):978–84.
- Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P.** Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol.* 2010. Jul 29; 144(1–2):166–71.
- Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, et al.** Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular Epidemiology and Utility of Different Typing Methods. *J Clin Microbiol.* 2009. 47(6):1620–7.
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M.** Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* 2005. 2005 Dec; 11(12):1965–6.
- Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehrlich R, Slickers P et al.** Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2009. Mar; 47(3):704–10.
- Weese JS.** Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J.* 2010. 51(3):233–44.
- Wenzel RP, Reagan DR, Bertino JS Jr, Baron EJ, Arias K.** Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *Am J Infect Control.* 1998. 26(2):102–10.
- Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C.** Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007. Feb; 13(2):255–8.
- Wulf M (a), Voss A.** MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen? *Clin Microbiol Infect.* 2008. Jun; 14(6):519–21.
- Wulf MW, Markestein A, van der Linden FT, Voss A, Klaassen C, Verduin CM.** First outbreak of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. *Euro Surveill.* 2008. pág. Feb 28; 13(9).
- Wulf MW, Sørum M, van Nes A, Skov R, Melchers WJ, Klaassen CH et al.** Prevalence of methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect.* 2008. Jan; 14(1):29–34.
- Wyllie DH, Crook DW, Peto TE.** Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997–2003: cohort study. *BMJ.* 2006. pág. August 5; 333(7562): 281.
- Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Conly JM.** 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 Chemoter.* 2009. 53(2):531–40.