



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de Biología Funcional
Área de Microbiología

**Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en
Staphylococcus aureus de diferentes orígenes:
relaciones con tipos genéticos**

José María Fueyo Mendoza

TESIS DOCTORAL

Oviedo-2005



Universidad
de Oviedo

Reservados todos los derechos
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo
Biblioteca Universitaria, 2007
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 4

ISBN: 978-84-690-6621-8
D.L.: AS.02275 -2007





UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de Biología Funcional
Área de Microbiología

**Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en
Staphylococcus aureus de diferentes orígenes:
relaciones con tipos genéticos**

Memoria presentada por *José María Fueyo Mendoza*
para optar al grado de *Doctor por la Universidad de Oviedo*

Oviedo-2005



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento
de Biología Funcional

RAMON GIRÁLDEZ CEBALLOS-ESCALERA, Director del
Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo:

AUTORIZA:

La presentación ante la Comisión de Doctorado de la Tesis Titulada
“Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en Staphylococcus aureus de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos”,
realizada por el Licenciado en Biología D. José María Fueyo Mendoza y
dirigida por Dña. Carmen Mendoza Fernández y Dña. M^a Cruz Martín
Martín

Oviedo a 5 de mayo de 2005






UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de Biología Funcional
Área de Microbiología

M. CARMEN MENDOZA FERNÁNDEZ
Profesora Titular de Microbiología
Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo

M. CRUZ MARTÍN MARTÍN
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA- CSIC)

CERTIFICAN:

Que el licenciado en Biología D. JOSÉ MARÍA FUEYO MENDOZA, ha realizado en el Departamento de Biología Funcional, y bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO, con el título:

“Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos”

Y para que así conste firman la presente certificación en Oviedo a 2 de mayo de 2005.

Fdo. M. Carmen Mendoza Fernández

Fdo. M Cruz Martín Martín

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A las directoras de esta tesis doctoral -doctoras M. Carmen Mendoza y M. Cruz Martín- por su asesoramiento científico inagotable, por su ayuda y estímulo constantes. Me considero muy afortunado por haber podido estar bajo su tutoría, siempre estaré en deuda con ellas.

A los directores del Departamento de Biología Funcional -profesores M. Ángeles Menéndez Pattersson y Ramón Giráldez- por las facilidades para la realización de sucesivas estancias cortas en dicho Departamento durante estos últimos años.

Al profesor Fernando Vázquez por acogerme e iniciarme en el campo de la Microbiología Clínica. Muchas gracias, maestro.

A la profesora M. Rosario Rodicio por su predisposición permanente en aclarar mis dudas, por tantas revisiones y por su apoyo incondicional.

A la doctora M. Ángeles González-Hevia por facilitarme cepas, datos epidemiológicos, ayuda con la estadística, y ante todo, por su afecto.

A los muchos compañeros y al personal de apoyo del Área de Microbiología por su ayuda, simpatía, y afectiva y efectiva acogida.

«To Stephen Hancock and GSK-Product Development to allow me to make compatible my professional activity with the ending of this Thesis».

Y a todas aquellas personas que habiéndome prestado su colaboración, de forma involuntaria, haya podido omitir.

A María por llenar mi vida, por su continuo aliento y admirable apoyo “logístico”.

A mis hermanos y a mi padre, y a una madre entregada a la causa, por casi todo... No os cambio por nada.

El trabajo experimental de esta tesis doctoral se ha realizado, en parte, en el marco de los proyectos de investigación financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, Referencias: FIS 00/1084 y FIS 02/0174.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
I.1.1. Reseña histórica y características generales	1
I.1.2. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .	2
I.1.3. Reservorios y hospedadores susceptibles de <i>S. aureus</i>	4
I.1.4. Manifestaciones clínicas en el hombre	5
I.1.5. Tratamiento y prevención de las infecciones estafilocócicas	
Emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos.	7
I.2. Enterotoxinas y otras toxinas pirogénicas superantígenos de <i>S. aureus</i>	9
I.2.1. Localización y organización de los genes que codifican PTSAGs:	
Profagos, plásmidos e islas de patogenicidad.	11
I.3. Clasificación o diferenciación intraespecie: métodos de tipificación	15
I.3.1. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
I.3.2. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)	19
I.3.4. Análisis de plásmidos.	20
I.3.5. Análisis de datos	22
II. OBJETIVOS	23
III. ARTÍCULOS	
ARTÍCULO 1: «Enterotoxin production and DNA fingerprinting in <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins»	25
ARTÍCULO 2: «Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in <i>Staphylococcus aureus</i> recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings»	33
ARTÍCULO 3: «Usefulness of genetic procedures in the identification of enterotoxigenic strains of <i>Staphylococcus aureus</i> associated with three food poisoning outbreaks in a Spanish region».	41
ARTÍCULO 4: «Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> from Asturias, Spain»	49
ARTÍCULO 5: «Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles in <i>Staphylococcus aureus</i> associated with subclinical mastitis in dairy cows, and relationships with macrorrestriction genomic profiles»	57
ARTÍCULO 6: «Humans and bovines constitute reservoirs of different sub-populations of <i>Staphylococcus aureus</i> in possession of the highly prevalent enterotoxin gene cluster <i>egc_{like}</i> »	64

IV. DISCUSIÓN

IV. 1. OBJETIVO 1. Establecer relaciones toxigénicas y genómicas entre <i>S. aureus</i> aislados de muestras nasales de portadores sanos y de alimentos manualmente procesados. Determinar la localización cromosómica y/o plasmídica de los genes de las enterotoxinas A-D y de la toxina del síndrome del <i>shock</i> tóxico.	68
IV.1.1 ¿Cuál es la proporción de aislamientos productores de los tipos clásicos de ETs y/o TSST-1 o portadores de sus genes?.	68
IV.1.2 ¿El grupo de <i>S. aureus</i> toxigénicos es genéticamente homogéneo o heterogéneo?. ¿Existe correlación entre perfiles de toxinas y polimorfismos del ADN?.	69
IV.1.3 ¿Los genes que codifican las cinco toxinas bajo estudio son de localización cromosómica o plasmídica?. ¿La localización es acorde con la publicada?.	70
IV.1.4 ¿Podría ser la información obtenida aplicable a fines de interés epidemiológico?	73
IV.2. OBJETIVO 2. Aplicar y evaluar métodos genéticos al diagnóstico microbiológico de brotes de intoxicación alimentaria por <i>S. aureus</i> .	73
IV.2.1. Identificación de cepas enterotoxigénicas de <i>S. aureus</i> implicadas en tres brotes comunitarios de intoxicación alimentaria	75
IV.2.2. Evaluación de los cuatro métodos genéticos utilizados como marcadores epidemiológicos en el diagnóstico de brotes de intoxicación alimentaria	76
IV.3. OBJETIVO 3. Hacer una primera aproximación a los tipos mas frecuentes o endémicos de <i>S. aureus</i> , con toxinas pirogénicas superantígenos de nueva descripción, en portadores nasales de Asturias.	77
IV.3.1 ¿Cuál es la proporción de aislamientos conteniendo genes-PTSAg “nuevos”?, ¿cuales son los genotipos-PTSAg de aislamientos productores y no productores de PTSAg “clásicas”?.	77
IV.3.2. ¿El perfil de genes de toxinas podría ser aplicable como marcador de clústeres e islas genómicas con genes-PTSAg en <i>S. aureus</i> de origen humano?	79
IV.3.3. ¿Cuáles son los tipos genómicos y las relaciones con genotipos-T en aislamientos de <i>S. aureus</i> productores y no productores de PTSAg “clásicas”?.	80
IV.3.4. ¿Qué tipos de <i>S. aureus</i> podrían ser considerados frecuentes y/o endémicos en portadores sanos de Asturias, utilizando como marcadores el genotipo-T y el perfil de macrorrestricción genómica?	80
IV.4. OBJETIVO 4. Determinar los genotipos de exotoxinas en aislamientos de <i>S. aureus</i> asociados con mastitis subclínica en vacas y establecer relaciones entre genotipos de virulencia y tipos genómicos. Trazar relaciones entre aislamientos de origen humano y bovino.	81
IV.4.1 ¿Cuál es la frecuencia de genes codificadores de exotoxinas en aislamientos de <i>S. aureus</i> procedentes de leche de vacas con mastitis subclínica?.	82
IV.4.2 ¿Cuáles son los perfiles de genes de exotoxinas en <i>S. aureus</i> asociados a mastitis subclínica?	83
IV.4.3 ¿Cuáles son los tipos y linajes de <i>S. aureus</i> asociados a mastitis subclínica en vacas en Asturias?	84
IV.4.4. Identificación de posibles relaciones genéticas entre aislamientos de <i>S. aureus</i> de origen humano y bovino en posesión del agrupamiento de genes de enterotoxinas <i>egc_{like}</i> .	86

V. CONCLUSIONES	88
VI. BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN	90
VII. ANEXOS	
ANEXO 1. Características de los aislamientos de <i>S. aureus</i> asociados a los tres brotes de intoxicación alimentaria estudiados en el Artículo 3.	96
ANEXO 2.1. Características generales de los aislamientos toxigénicos de <i>S. aureus</i> procedentes de alimentos de elaboración manual.	98
ANEXO 2.2. Características generales de los aislamientos de <i>S. aureus</i> procedentes de muestras nasales de humanos portadores sanos y portadores de genes-PTSAg y/o leucotoxinas.	99
ANEXO 2.3. Características generales de los aislamientos de <i>S. aureus</i> procedentes de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica.	102
ANEXO 3.1. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la detección de genes de exotoxinas de <i>S. aureus</i> .	104
ANEXO 3.2. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la amplificación de secuencias aleatorias (RAPD).	105

ABREVIATURAS

a.: aislamiento
Ag: antígeno
ATCC: *American Type Culture Collection*
BrEt: bromuro de etidio
agr: *accessory gene regulator*
AM: alimentos con alguna fase de procesado manual
a_w: actividad de agua
B1-B3: brotes 1-3 de intoxicación alimentaria
bsa, gen que codifica bacteriocina
CMH de clase II (*Class II MHC*): complejo mayor de histocompatibilidad
CNM: Centro Nacional de Microbiología
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
CPA (APC): célula presentadora de antígenos
CBA: *Columbia Blood Agar*
DI/ID: índice de discriminación/*discrimination index*
ear, gen que codifica una beta-lactamasa estafilocócica
egc: *enterotoxin gene cluster* (agrupamiento de genes de enterotoxinas)
ETs: *epidermolytic toxins* (toxinas epidermolíticas o exfoliatinas)
eta, etb, etd: genes que codifican ETA, ETB, ETD, respectivamente
genotipo T (GT): perfil de genes de toxinas
hla, hlb, hlg, hld y hld-2: genes que codifican las hemolisinas alfa, beta, gamma, delta y delta-2, respectivamente
Ig: inmunoglobulina
IL-1, IL-2: interleucina 1, interleucina 2
L: linaje
LSP: Laboratorios de Salud Pública
LukE/LukD (LukED): leucotoxina ED
lukED: genes que codifican LukE/LukD
LukM/LukF'-PV: leucotoxina M
lukM: gen que codifica LukM
LukS-PV/LukF-PV o LukPV: leucotoxina Panton Valentine
lukPV: genes que codifican LukS-PV/LukF-PV
MRSA: *Meticillin Resistant S. aureus* (*S. aureus* resistente a meticilina)
mecA: gen de resistencia a meticilina
NCTC: National Collection of Type Cultures
ORF: *Open Reading Frame* (pauta de lectura abierta)
PAI: *pathogenicity island* (isla de patogenicidad)
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
plásmidos-T: plásmidos con genes de enterotoxinas
PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (electroforesis en campo pulsante)
PRP: perfil de restricción plasmídico
PS: portadores de *S. aureus* sanos
PTSag: *Pyrogenic Toxin Superantigen* (toxina pirogénica superantígeno)
pUO-SED: plásmido de la Universidad de Oviedo con SED.
RAPD: *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (amplificación al azar de ADN polimórfico)
S: coeficiente de similitud
SaPI o vSa: *S. aureus Pathogenicity Island* (isla de patogenicidad de *S. aureus*)
SaPIbov: SaPI de origen bovino
SCCmec: *Staphylococcus Cassette Chromosome-mec* (isla genómica de *S. aureus* con el gen *mecA*)
SEs: enterotoxinas estafilocócicas.
sea-see, seg-ser, seu: genes que codifican SEA-SEE, SEG-SER y SEU, respectivamente
set: gen que codifica exotoxina estafilocócica
SET-RPLA: *Staphylococcal Enterotoxins-Reversed Passive Latex Agglutination*
SSSS: *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome* (síndrome estafilocócico de la piel escaldada)

spl: gen que codifica *serin proteasa*

Taq: *Thermus aquaticus*

TCR: *T cell receptor* (receptor de linfocitos-T colaboradores)

TSST-1: *Toxin Shock Syndrome Toxic* (toxina del síndrome del *shock* tóxico)

tst: gen que codifica TSST-1

TST-RPLA: *Toxin Shock Toxic-Reversed Passive Latex Agglutination*

RESUMEN

Staphylococcus aureus de diferentes orígenes (muestras nasales de portadores humanos, alimentos manipulados, y leche de vacas con mastitis subclínica), recogidos en Asturias (1996-2002), han sido analizados mediante técnicas convencionales y moleculares para determinar la frecuencia y los tipos de genes de toxinas pirogénicas superantígenos (PTSAg) que portan y el polimorfismo de su ADN con objeto de establecer relaciones toxigénicas y genómicas entre aislamientos. La interrelación de los resultados, y su comparación con lo publicado sobre el tema, permite resaltar como hallazgos relevantes:

- Porcentajes del 31,2; 26; y 14,3 de los aislamientos analizados, recogidos de muestras humanas, bovinas y de alimentos, respectivamente, producían una o más PTSAg-clásicas (enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, y toxina del síndrome del *shock* tóxico) y portaban sus genes, generalmente en asociación con genes de otras toxinas de nueva descripción.
- Diferentes aislamientos contenían entre 0-9 genes de PTSAs y entre 0-2 de leucotoxinas (siendo todos ellos negativos para *see*, *sep*, *seq*, *eta*, *etb*, y todos excepto uno bovino para *etd* y otro humano para *lukPV*), que se agruparon en perfiles de genes o genotipos-T. Es destacable que el 39,7 y 0% de los aislamientos humanos frente al 98,8 y 50% de los bovinos portaban *lukED* y *lukM*, respectivamente. Este hecho podría estar en relación con el papel meramente colonizador de los primeros y patogénico de los segundos.
- El análisis del polimorfismo de DNA genómico, mediante macrorrestricción (*SmaI*-PFGE) discriminó a los aislamientos en perfiles-*SmaI* y éstos se agruparon en linajes (coeficientes de similitud $\geq 0,7$). De esta forma se observó que los linajes más frecuentes representados por aislamientos humanos incluían, también, aislamientos de alimentos, pero no bovinos.
- Se encontró una fuerte relación entre genotipos-T (incluyendo genes de PTSAg clásicas) y perfiles-*SmaI* en los tres grupos de aislamientos y de ambos marcadores con el perfil de plásmidos en aislamientos humanos y de alimentos. Los genes asociados a la agrupación *egc_{like}* (*seg-sei-sem-sen-seo* \pm *seu*), y los genes *lukED*, se pueden considerar ubicuos, dado que estaban presentes en aislamientos de los tres grupos con perfiles-*SmaI* de baja similitud.
- Se detectaron asociaciones de genes compatibles con elementos genéticos ya descritos, en cepas de *S. aureus* de origen humano (*seb-sek-seq* con SaPI3, *sec-sel-sem* con SaPI4, y *sed-sej-ser* con plásmidos-SED “clásicos” de 33-36 kb), bovino (*tst-sec-sel* con SaPIbov), y en ambos grupos (*egc_{like}-lukED* con vSa β). Además, se pueden considerar de nueva descripción: la inserción en el cromosoma de *S. aureus* del agrupamiento plasmídico (*sed-sej-ser*); la posible localización de los genes *seb*, *sec*, y *tst* en elementos genéticos no descritos; y la presencia de un plásmido de 53,5 kb con los genes *sed-sej-ser_{like}* en dos aislamientos de alimentos.
- Se pudo hacer una primera aproximación a los tipos o linajes de *S. aureus* prevalentes y/o endémicos en Asturias, tanto en portadores humanos como en bóvidos; y adscribir seis cepas asociadas a cuatro brotes de intoxicación alimentaria a tres de los linajes humanos. Los resultados apoyan la hipótesis de que humanos y bóvidos constituyen reservorios de distintas subpoblaciones de *S. aureus* en posesión de la agrupación genómica *egc_{like}*.

El presente trabajo es de interés en Microbiología, Epidemiología Molecular, Salud Pública, Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria, y podrá ser utilizado como base para futuros estudios sobre el tema en todos y cada uno de estos campos.

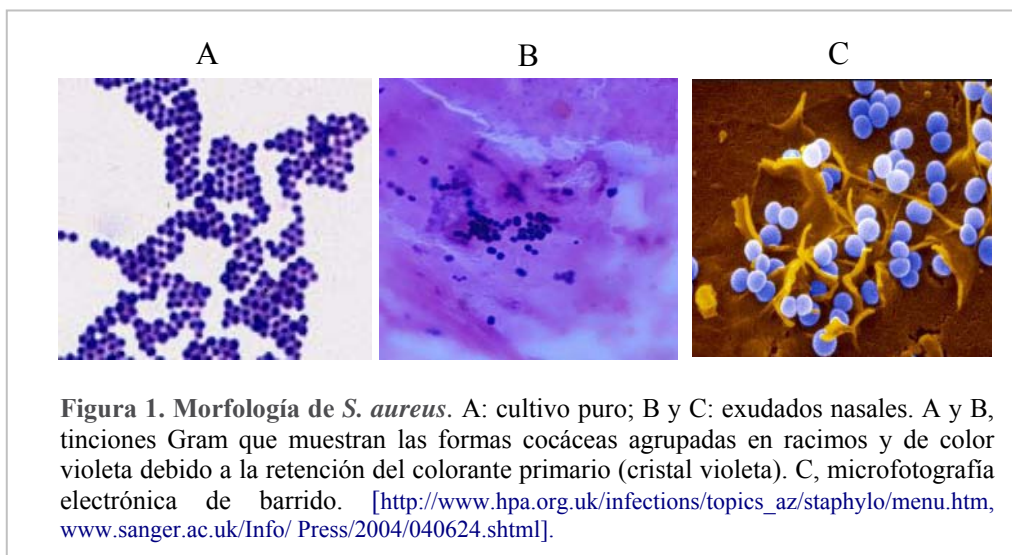
I. INTRODUCCIÓN

I.1. *Staphylococcus aureus*

I.1.1. Reseña histórica y características generales

El término *Staphylococcus* viene del griego *staphyle*=racimo y *kokkos*=granos, denominación inicialmente otorgada por Ogston hacia 1880 aunque tanto Koch como Pasteur lo habían también observado. Ya en 1884 se relacionó su presencia con infecciones en heridas y osteomielitis, y desde entonces hasta nuestros días está de actualidad en el mundo de la Microbiología Sanitaria debido a su potencial para provocar un amplio espectro de cuadros infecciosos y toxigénicos, así como por estar implicado en importantes brotes o epidemias hospitalarias y comunitarias.

El Género *Staphylococcus* pertenece al Phylum 2 del Dominio *Bacteria*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales*; y Familia *Staphylococcaceae*. Son bacterias Gram-positivas, no esporuladas, con bajo contenido en GC [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001]. Tienen forma de cocos, de tamaño 0,8-1 μm de diámetro, y una presentación característica en agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas debido a su capacidad para dividirse en tres planos (Figura 1). Son bacterias aerobias o anaerobias facultativas y son siempre inmóviles. El género incluye 19 especies, de las que algunas son patógenas oportunistas para el hombre y animales.



La especie tipo, *S. aureus* o “estafilococo dorado”, tiene todas las características típicas del género: anaerobio facultativo, mesófilo, necesita aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa (y también el manitol) con producción de ácido, y tolera condiciones ambientales muy variables. Así, puede crecer a cualquier temperatura entre 6 y 46 °C, con el óptimo en 30-37 °C. En cuanto al pH, se desarrolla entre valores de 4,0 y 9,8 con el óptimo en torno a la neutralidad. Es igualmente tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones de hasta un 20% de NaCl, siendo ésta una propiedad utilizada para crear condiciones selectivas en medios de cultivo para su aislamiento y propagación. Este carácter permite su crecimiento en alimentos con muy baja actividad de agua (a_w), desde 0,99 hasta 0,83 y un valor óptimo de 0,94. También es bastante resistente a la desecación, la congelación y el calor, aunque no tanto como las endosporas de las bacterias esporuladas.

I.1.2. Factores de virulencia de *S. aureus*.

S. aureus, es la especie de estafilococos más virulenta para el hombre, y se caracteriza por poseer componentes estructurales y producir numerosos enzimas considerados factores de virulencia los cuales son recopilados en la Tabla 1.

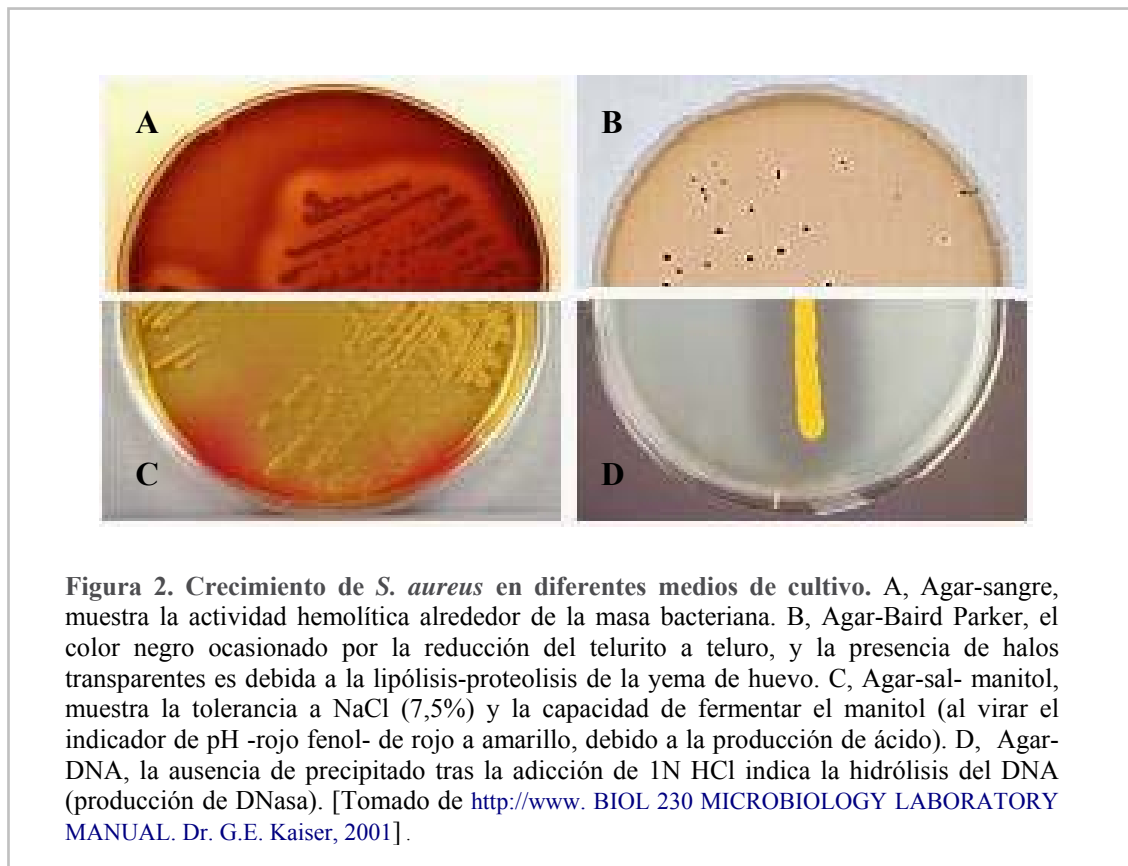
Tabla 1. Determinantes de patogenicidad o factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	
Determinante	Función
Componente de la pared celular	
Peptidoglicano	Activación del complemento, otras
Acidos teicoicos	Antifagocitaria
Proteína A	Antifagocitaria
Adhesinas	Adherencia a células-hospedador, colonización
Cápsula mucoide y microcápsulas	Adherencia y antifagocitario
Enzimas	
Coagulasa	Formación de abscesos
Estafiloquinasas	Destrucción de coágulos
Hialuronidasa	Invasión hística
Catalasa	Supervivencia en fagocitos
Lipasas	Invasión-colonización
Termonucleasa	Hidrólisis del ADN
Toxinas	
Hemolisinas	Rotura de membranas celulares
Leucocidinas	Alteración de la permeabilidad celular
Toxinas exfoliativas	Epidermolisis
Toxina TSST-1	<i>Shock</i> tóxico
Enterotoxinas	Intoxicación alimentaria
Bacteriocinas	Matar a otras bacterias
Tomado de García-Rodríguez y Picazo, 1996; Mandell et al., 2000.	

Componentes importantes de la pared celular. El componente básico, que confiere forma y estabilidad al microorganismo y representa el 50% de la pared es el **peptidoglicano**. Este es un polímero polisacárido compuesto por subunidades alternantes de N-acetilmurámico (con una cadena de cuatro aminoácidos: L-alanina-D-glutámico-L-lisina-D-alanina) y N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces β -(1-4). Las cadenas peptídicas laterales unidas al residuo de ácido murámico, están ligadas en forma cruzada por un puente de pentaglicina adherido a la L-lisina de una cadena y a la D-alanina de la otra cadena. Entre sus propiedades biológicas destacan su capacidad para inducir la producción de interleucina-1 (IL-1) por monocitos humanos y una reacción local capaz de atraer a leucocitos polimorfonucleares (PMN), activar el complemento y estimular la producción de anticuerpos opsonicos [Mandell et al., 2000].

Otros componentes incluyen los **ácidos teicoicos** que contribuyen con alrededor del 40% al peso de la pared celular. Algunos de ellos (formados por una secuencia alternativa de ribitolfosfato) están unidos de forma covalente al peptidoglicano y otros (unidades repetidas de glicerol-fosfato) a la membrana citoplasmática. La adherencia a la mucosa nasal es mediada por los ácidos teicoicos. Embebida en la capa externa del peptidoglicano está la **proteína A** (tamaño: 42.000 daltons) presente

en cantidades variables en distintas cepas, su reacción con los mecanismos del hospedador consiste en enlazarse con el terminal Fc de todas las inmunoglobulinas, excepto la IgG3. Entre las **adhesinas** asociadas a pared celular que promueven la adherencia de la bacteria a las células del hospedador están las proteínas de unión a la fibronectina y al colágeno. Finalmente, muchas cepas están recubiertas por una capa externa de polisacáridos, que suele considerarse como **cápsula** o capa viscosa, que puede liberarse durante la infección focal y ser detectada en el suero del hospedador infectado [Mandell et al., 2000].

Las múltiples interacciones de estos compuestos de superficie determinarán por un lado la formación de biopelículas (*biofilms*) que contribuyen a la adherencia a superficies celulares y a materiales inertes (incluidas prótesis y catéteres), y por otro lado a la respuesta general del hospedador a la infección por *S. aureus* [Mandell et al., 2000; Miller y Bassler, 2001].



Exoproteínas con acción enzimática y/o tóxica. Los estafilococos excretan numerosas proteínas con función enzimática y/o tóxica. Enzimas y exotoxinas, son caracteres variables en diferentes cepas, y junto con un carotenoide que confiere a las colonias una coloración amarilla o naranja, se utilizan para definir “biotipos”. La **catalasa** y los **carotenoides** aumentan la supervivencia en los macrófagos. Diferentes enzimas como **proteasas**, **lipasas**, **lecitinasa**, **hialorunidasa**, **estafiloquinasa**, **coagulasa ligada ó clumping factor**, **coagulasa libre**, y **termonucleasa (DNasa)**, intervienen en la degradación de tejidos y macromoléculas facilitando nutrientes para el crecimiento de la bacteria y provocando, al menos en parte, los síntomas de diferentes cuadros clínicos. La detección de algunas de estas moléculas se ha utilizado como carácter diferencial en medios de cultivo (Figura 2 B-D) y en el diseño de esquemas de identificación.

La **coagulasa**, que provoca la coagulación de la sangre (el fibrinógeno pasa a fibrina que forma los coágulos), es el carácter asociado a la especie y vinculado a patogenicidad más relevante. Los coágulos inducidos por la coagulasa dan lugar a la acumulación de fibrina alrededor de las bacterias protegiéndolas frente a los agentes inmunitarios del hospedador, fundamentalmente frente a la fagocitosis [Mandell et al., 2000; Dinges et al., 2000; Madigan et al., 2003].

La mayoría de las cepas de *S. aureus*, produce algún tipo de hemolisinas, que dañan las membranas de las células eucariotas, incluyendo los glóbulos rojos, lisándolas (Figura 2A). Actualmente hay descritas cinco **hemolisinas**: alfa, beta, gamma, delta y delta-variante. Por el contrario sólo una minoría de cepas produce una potente **leucotoxina** (asociada a neumonía necrotizante) que ejerce acción exclusiva sobre células humanas y de conejo, la leucocidina de Pantón Valentine. Las leucotoxinas (al igual que gamma-hemolisina), son toxinas bi-componentes (uno esencial para la adherencia a la célula del hospedador y el otro el tóxico y citolítico) que destruyen leucocitos provocando la producción de pus. Se han descrito tres: la ya citada leucocidina de Pantón Valentine (LukS-PV/LukF-PV) y otras dos menos virulentas y de descripción reciente (LukM/LukF'PV y LukE/LukD). Un importante porcentaje de cepas de *S. aureus* produce, también, algún tipo de toxinas pirogénicas superantígenos (**exfoliatinas**, **toxina del síndrome del shock tóxico** y **enterotoxinas**) cuyas características se exponen en el apartado I.2 [Mandell et al., 2000, Dinges et al., 2000].

Además, algunas cepas tienen capacidad para producir **bacteriocinas**, que son de naturaleza peptídica, inhiben el crecimiento de cepas y especies de bacterias diferentes en un amplio espectro, y pueden aportar a la cepa productora ventajas tanto en la colonización de la mucosa nasal de portadores sanos como en procesos infecciosos mixtos (poliinfecciones).

El sistema regulador *quorum sensing*. *Quorum sensing* es la regulación de la expresión génica en respuesta a fluctuaciones de la densidad celular. En las bacterias se producen y excretan moléculas químicas a modo de señales (autoinductores) cuya concentración se incrementa en función de la densidad celular. La detección por el microorganismo de una concentración estimuladora mínima lleva a una alteración en la expresión génica. Las bacterias utilizan rutas de comunicación *quorum sensing* para regular diversas actividades fisiológicas incluyendo: simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, motilidad, esporulación y formación de biofilms [Miller y Bassler, 2001]. En *S. aureus*, el locus *agr* (*accessory gene regulator*) es el responsable del control de la expresión de numerosos determinantes de virulencia vía *quorum sensing* [Jarraud et al., 2002]. Actualmente el bloqueo del *quorum sensing* se presenta como una nueva estrategia para atenuar la infección y una alternativa al tratamiento con antimicrobianos [Wright et al., 2005; Otto, 2004].

Es importante señalar que la mayoría de las enfermedades provocadas por *S. aureus* resultan de la acción combinada de varios determinantes de patogenicidad con diversas funciones: adherencia, invasión de tejidos, evitar la fagocitosis y toxigenicidad. En el desarrollo y pronóstico de la enfermedad, también son factores determinantes los dependientes del hospedador [García-Rodríguez y Picazo, 1996; Mandell et al., 2000, Torres et al., 2001].

I.1.3. Reservorios y hospedadores susceptibles de *S. aureus*

El hombre es un importante reservorio de *S. aureus*, siendo la mucosa nasal su hábitat primario, desde donde pasa a otras áreas corporales como la cavidad orofaríngea, las vías respiratorias altas, la piel, las glándulas mamarias, los aparatos genitourinario e intestinal. En determinadas zonas del cuerpo humano la presencia de una microbiota competitiva inhibe su crecimiento. La tasa de

portadores nasales adultos se estima alrededor del 20-40% lo que depende de factores estacionales y epidemiológicos locales [Fernández-Crehuet et al., 2001; Mandell et al., 2000]. Algunos grupos de personas parecen ser más susceptibles a la colonización que otras y es posible que haya varias cepas en un mismo hospedador [Jay, 1993; Mandell et al., 2000; Mossel et al., 2002; Le Loir et al., 2003].

S. aureus, además del hombre, tiene un amplio reservorio animal. De hecho posee otros reservorios relacionados con la alimentación humana, principalmente el ganado y las aves de corral. En los animales puede producir cuadros clínicos similares a los humanos, pero además, en los rumiantes productores de leche origina la mastitis o infección de las glándulas mamarias. Si las cepas infectivas son enterotoxigénicas y pasan a la leche, ésta y los alimentos lácteos derivados se pueden convertir en una posible fuente de intoxicación alimentaria [Jay, 1995., Mandell et al., 2000; Fernández-Crehuet et al., 2001; Mossel et al., 2002; Le Loir et al., 2003].

La Reglamentación Técnico Sanitaria solamente obliga o recomienda cuantificar la presencia de *S. aureus* enterotoxigénicos (asociados a la producción de DNasa) en los diferentes tipos de alimentos de origen animal, siendo la normativa más rigurosa para los derivados lácteos, la carne y sus subproductos, los artículos de bollería-pastelería, las pastas alimenticias, huevos cocidos y yema salada [Pascual y Calderón, 2000]. Para ello, existe un protocolo de trabajo con categoría de *International Standard* [ISO6888-3:2003 en <http://www.iso.ch/iso/en/ISOOnline.frontpage>] así como los límites recomendados para los diferentes alimentos de riesgo [http://cvu.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311175-1/*Enlaces/enlaces.htm]. Además, se han creado “REDES” internacionales de vigilancia de patógenos en alimentos, como la europea y la de USA [http://www.euro.who.int/foodsafety/Surveillance/20020903_3] y [<http://www.cdc.gov/foodnet>], respectivamente. Por otro lado, el Reglamento de Manipuladores de Alimentos (Reales Decretos 2505/1983 y 202/2000) apuesta por la educación sanitaria en detrimento de los exámenes médicos/microbiológicos a los manipuladores. De hecho, éstos sólo suelen realizarse cuando hay sospecha de brotes o situaciones epidémicas.

I.1.4. Manifestaciones clínicas en el hombre

Las patologías clínicas asociadas a colonización-infección por *S. aureus* en el hombre se recogen en la Tabla 2. Ya se ha indicado que el porcentaje de portadores nasales adultos se estima alrededor del 20-40% [Fernández-Crehuet et al., 2001; Mandell et al., 2000] y que desde la mucosa nasal pasa a otras áreas corporales.

La lesión anatómica básica inducida por *S. aureus* es un exudado piógeno o un absceso. La infección directa por rotura profunda de la piel u otra lesión, así como el drenaje de abscesos al medio interno, los catéteres, las heridas accidentales o quirúrgicas, pueden permitir que las bacterias atraviesen las defensas del organismo y causen una infección sistémica (septicemia e infecciones metastásicas). A veces, tras la diseminación septicémica se producen cuadros clínicos mixtos o complejos. Además, en ciertas circunstancias la producción de exotoxinas puede tener lugar y provocar toxemia o toxinosis [García-Rodríguez y Picazo, 1996; Mandell et al., 2000; Dinges et al., 2000; Torres et al., 2001; Peacock et al., 2002; http://www.emedicine.com/derm/BACTERIAL_INFECTIIONS.htm].

Los individuos proclives a las infecciones estafilocócicas son los recién nacidos, las mujeres en período de lactancia, las personas con enfermedades crónicas (especialmente afecciones pulmonares, diabetes y cáncer), las que presentan afecciones cutáneas e incisiones quirúrgicas y aquellas cuyos sistemas inmunológicos están inhibidos por el uso de corticosteroides, radioterapia, fármacos inmunodepresores o medicaciones anticancerosas. *S. aureus* es un importante patógeno tanto

nosocomial como comunitario, siendo capaz de infectar distintos tejidos y órganos, causando patologías que a veces son extremadamente graves, y en algunos de los cuadros clínicos pueden estar implicados un amplio espectro de factores de virulencia [Dinges et al., 2000; Mandell et al., 2000; Von Eiff et al., 2001; Torres et al., 2001; Peacock et al., 2002; Becker et al., 2003].

Tabla 2. Patologías clínicas asociadas a colonización/infección por *S. aureus*

Estado de portador: nasofaringe, piel, vagina, etc

Infección directa

- Piel: foliculitis, ántrax, impétigo, hidradenitis, celulitis, abscesos, infecciones de heridas, etc.
- Infecciones profundas, a menudo después de traumatismos, cirugía, inserción de cuerpos extraños, bursitis, artritis, osteomielitis

Infección hematógena secundaria a infección directa

- Bacteriemia/sepsis
- Infección metastásica: artritis, osteomielitis, meningitis, endocarditis, pericarditis, absceso pulmonar, etc

Enfermedad mediada por toxinas (en asociación con estado de portador o infección directa).

- Síndrome de la piel escaldada
- Síndrome del *shock* tóxico con fallo multiorgánico
- Intoxicación alimentaria

Tomado de Mandell et al., 2000; Kaiser, 2001; Peakock et al., 2002.

Las enfermedades mediadas por toxinas pirogénicas superantígenos pueden estar asociadas al estado de portador o a episodios de infección directa. **El síndrome estafilocócico de la piel escaldada (SSSS)**, es causado por cepas que están presentes en zonas localizadas de infección (nasofaringe principalmente, ombligo, aparato urinario, abrasiones superficiales, conjuntiva y sangre). Las manifestaciones clínicas están mediadas por la diseminación hematógena de las toxinas exfoliativas (ETs), en ausencia de anticuerpos antitoxina específicos. Los pacientes generalmente son menores de seis años de edad, con el antecedente de una infección clínica o subclínica por estafilococo y que presentan fiebre y amplias zonas eritematosas muy sensibles. En la piel escaldada, la piel se descama en láminas dejando áreas desnudas; comúnmente se afectan las regiones peribucal, genital y torácica, pero puede comprometerse cualquier parte del cuerpo, mientras que en el impétigo tiene lugar la formación de pequeñas ampollas llenas de pus (pústulas). También puede cursar con una sintomatología similar a la fiebre escarlata producida por estreptococos. Son enfermedades de distribución mundial, que surgen esporádicamente en los hospitales, el reservorio del agente infeccioso es el ser humano y el modo primario de transmisión es la diseminación por medio de las manos. La incubación comúnmente es de 4 a 10 días y el período de transmisibilidad, mientras persistan las lesiones [Mandell et al., 2000].

El síndrome del *shock* tóxico (SST), describe un conjunto de síntomas que comprometen diversos sistemas del cuerpo y cursa con fiebre alta, hipotensión, inflamaciones, erupciones cutáneas diseminadas, disfunción multiorgánica y ocasionalmente muerte. La mayor parte de las manifestaciones

clínicas están mediadas por la diseminación hematogena de la toxina TSST-1 en ausencia de anticuerpos antitoxina específicos. Algunas SEs también pueden estar implicadas [Alouf y Müller-Alouf, 2003]. El SST se identificó por primera vez a finales de la década de 1970 y a principios de la década de 1980, cuando el uso de tampones de gran absorción durante la menstruación estaba muy difundido. La sangre y el mucus vaginal favorecen el desarrollo de las cepas de estafilococos constituyentes de la microbiota vaginal, el tampón concentra el material y facilita la colonización. Debido a los cambios en la fabricación de los tampones, la incidencia del SST inducido por tampón ha disminuido, siendo actualmente raro. Sin embargo, se siguen considerando poblaciones de riesgo de SST las personas sometidas a operaciones de cirugía, individuos con diabetes, SIDA, enfermedad pulmonar crónica o enfermedad cardíaca [Mandel et al.; 2000, Alouf y Müller-Alouf, 2003].

La **intoxicación alimentaria estafilocócica** resulta del consumo de alimentos en los que *S. aureus* se ha multiplicado por encima de 10^5 ufc/g y producido enterotoxinas (SEs). Las SEs son resistentes al calor (desde 5-10 minutos a 121 °C hasta varias horas a 80-100 °C), a la irradiación gamma (valores *D* entre 27-93 kGy) y a la acción de las proteasas intestinales como la pepsina. La cantidad necesaria de enterotoxina requerida para causar la intoxicación es muy pequeña del orden de $0,5\mu\text{g kg}^{-1}$ en monos y 90 ng en el hombre, siendo para éste la dosis emética del orden de $0,2\mu\text{g kg}^{-1}$. Este nivel se alcanza en poblaciones de *S. aureus* mayores de 10^5 células por gramo [Balaban y Rasooly, 2000; Mossel et al., 2002; <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>]. El cuadro clínico se caracteriza por un período de incubación de entre 2 y 6 horas, y una sintomatología de náuseas, vómitos violentos, dolor abdominal, seguido de diarrea profusa. Aunque realmente no es grave en el sentido clínico y sólo rara vez termina en muerte, si es muy desagradable, causando incapacidad total durante un corto período de tiempo. A diferencia de otras enterotoxinas bacterianas las SEs no actúan directamente sobre el revestimiento del tracto intestinal, no causando acumulación de líquido en asas intestinales ligadas. Actúan como superantígenos uniéndose a las cadenas β del receptor de los linfocitos T colaboradores en el intestino (ver Figura 4), provocando la acción enterotóxica. Además, actúan sobre centros nerviosos del intestino; las señales son transmitidas al centro reflejo emético de la médula, vía nervio vago y sistema simpático. Siendo la capacidad emética la que las diferencia de otras PTSAs. [Mandell et al., 2000; Torres et al., 2001; Alouf y Müller-Alouf, 2003]. La mayor parte de los brotes descritos hasta la fecha han sido causados por cepas que producían SEA y/o SED [Jay, 1994; Suzuki et al., 1999; Mossel et al., 2002; Le Loir et al., 2003; Wei y Chiou, 2002]. El descubrimiento en los últimos años de muchas SEs lleva a pensar que algunas de ellas podrían ser tan o más frecuentes como causa de intoxicación que las dos toxinas clásicas citadas [Jarraud et al., 2001, 2002; Rosec y Guiraud, 2002; Omoe et al., 2003].

I.1.5. Tratamiento y prevención de las infecciones estafilocócicas. Emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos

La elección de un antibiótico depende del lugar de la infección, la gravedad de la enfermedad y cuál de los antibióticos elimina las bacterias con mayor eficacia [Mandell et al., 2000; Mensa et al., 2003]. Para la mayoría de las infecciones cutáneas, los antibióticos orales como la cloxacilina y la eritromicina resultan adecuados. Las infecciones más graves, en especial las de la sangre, requieren terapia intravenosa, en general durante 6 semanas. En estos casos se utilizan, en cepas sensibles a meticilina: amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas, imipenem, fluorquinolonas, y clindamicina; y en cepas resistentes a meticilina: linezolid, quinupristina-dalfopristina, trimetoprim-sulfametoxazol y glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina). La fosfomicina, el ácido fusídico y la rifampicina pueden ser activos pero no deben utilizarse como antibiótico único, porque generan con facilidad mutantes resistentes. Para eliminar el estado de portador, la mupirocina -sola o en combinación con la rifampicina o el trimetoprim-sulfametoxazol- resulta eficaz [Mandell et al., 2000; Mensa et al.,

2003]. La intoxicación alimentaria no se trata con antimicrobianos, dado que es causada por toxinas preformadas en el alimento colonizado por *S. aureus*.

Los abscesos deben drenarse. Cuando están sobre la piel, ello es relativamente simple, basta con realizar un pequeño corte en la zona y ejercer presión para eliminar el material infectado. Los localizados en zonas más profundas del cuerpo pueden necesitar cirugía. Por otro lado, es difícil proponer recomendaciones precisas para evitar el síndrome de *shock* tóxico. En términos generales, las mujeres deberían evitar el uso continuado de tampones durante la menstruación sobre todo los superabsorbentes. Si se sospecha que un individuo tiene este síndrome, es necesario hospitalizarlo de inmediato, retirarle el “objeto extraño” y administrarle antibióticos lo antes posible [Mandell et al., 2000; Mensa et al., 2003; http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_17].

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de un aislamiento (y del subconjunto de esa especie) es importante, no sólo para el tratamiento de un paciente, sino también para monitorizar la diseminación de organismos multirresistentes ó de genes de resistencia a través del hospital y la comunidad. La extensiva aplicación de los antibióticos ha tenido como consecuencia la selección natural de cepas resistentes a las moléculas en uso. De hecho, *S. aureus* se ha convertido en un microorganismo resistente a gran parte de las penicilinas y en algunos casos incluso también a cefalosporinas y otros antimicrobianos. Desde el descubrimiento y aplicación terapéutica de las primeras penicilinas, mas de un 90% de las cepas de *S. aureus* ha adquirido resistencia a estas moléculas (penicilina G, ampicilina, etc) debido a la acción de una β -lactamasa. Por ello se diseñaron moléculas (metecilina, oxacilina, dicloxacilina) que escaparan a la inactivación, pero también se seleccionaron cepas resistentes (SAMR). En este caso debido a la adquisición del gen *mecA* que codifica una forma alterada de una proteína de unión a la penicilina, la PBP 2a, que tiene una afinidad reducida para los antibióticos β -lactámicos [Chambers et al.; 1990, Mandell et al., 2000; Sanjay et al., 2004]. El gen *mecA* está localizado en el cromosoma formando parte de una familia de islas de patogenicidad, denominada SCC*mec* [ver Apartado I.2].

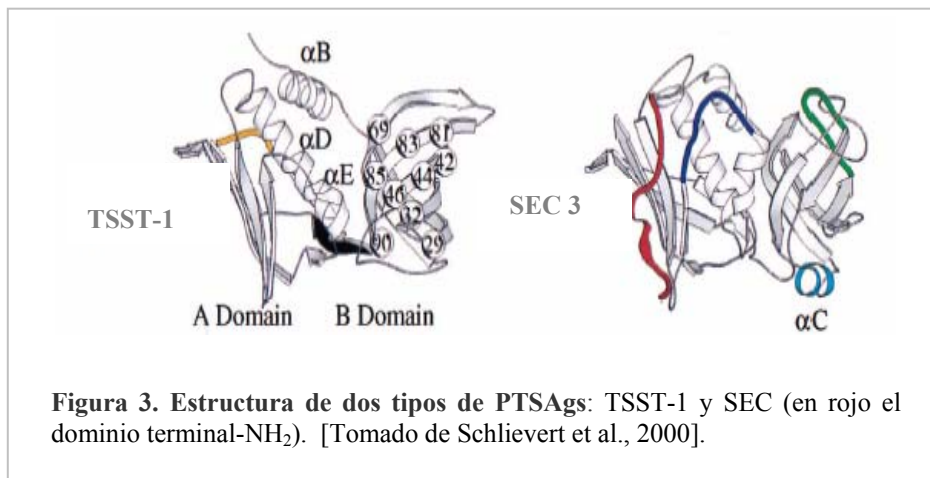
En nuestros días la aparición de nuevas cepas SAMR, generalmente, va acompañada de otras resistencias tanto a β -lactámicos como a otros antibióticos, y su frecuencia es variable en diferentes países [Fluit et al., 2001]. En un estudio realizado para conocer la situación en España, en el que participaron 143 hospitales, se encontró que una parte importante de los aislamientos de *S. aureus* recogidos en 2002 eran resistentes a oxacilina (31,2%), eritromicina (31,7%), gentamicina (16,9%) y ciprofloxacino (33,9%). Sin embargo, la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol era muy baja y todos los aislamientos analizados eran susceptibles a glicopeptidos, linezolid, y quinupristina-dalfopristina [Cuevas et al., 2004]. Los antibióticos glicopéptidos, aunque son una excelente herramienta terapéutica frente a infecciones estafilocócicas, ya están bajo alerta dado que han aparecido cepas resistentes a la vancomicina [Fluit et al., 2001; Gobernado, 2002]. Este hecho está dificultando seriamente el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* en algunos casos, llegando a convertirse en un problema de primera magnitud cuando se habla de ambientes hospitalarios. En contraste con estos datos están los obtenidos en nuestro laboratorio en aislamientos procedentes de portadores nasales sanos (n=68) y de alimentos manipulados (n=40) entre los que sólo se detectaron aislamientos resistentes a los antibióticos ampicilina, eritromicina o ambos, en porcentajes del 64,7; 4,4 y 8,8 en portadores vs 35; 4,7; y 7,5 en alimentos, respectivamente [Martín et al., 2001].

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 (cuidado de niños en guarderías, cuidado de ancianos, funciones de enfermería en hospitales, así como manipulación de alimentos) las personas portadoras deben de ser excluidas o tratadas con antimicrobianos para eliminar su estado de portador.

En los hospitales *S. aureus* es un microorganismo causante de numerosos e importantes brotes. Esto es debido a su difícil eliminación, fácil transmisión por contacto persona-persona, el uso de agujas y catéteres, así como la inhalación del aire contaminado y el estado de los pacientes que los habitan, hechos que facilitan la aparición y diseminación de cepas categorizadas como nosocomiales. Existe una fuerte evidencia de que una alta proporción de los casos de bacteriemia por *S. aureus* parecen tener un origen endógeno por cepas presentes en la mucosa nasal del enfermo, dato que apoyaría el establecimiento de tratamientos de erradicación preventiva [Von Eiff et al., 2001].

I.2. Enterotoxinas y otras toxinas pirogénicas superantígenos de *S. aureus*

Las toxinas pirogénicas superantígenos (PTSAg) son proteínas exocelulares de tamaños entre 22,5 y 28,5 kDa, ricas en aminoácidos hidrofílicos. *S. aureus* produce tres grupos de PTSAg: enterotoxinas (SEs), toxinas del síndrome del shock tóxico (TSST) y exfoliatinas (ETs, toxinas exfoliativas o epidermolíticas) [Dinges, 2000; Torres et al., 2001; Alouf y Müller-Alouf, 2003]. Cada molécula está constituida fundamentalmente por estructuras beta (conformaciones en las que el polipéptido se halla extendido), aunque también incluyan algunas estructuras de hélice alfa (conformaciones en las que el esqueleto de la proteína toma la forma de un muelle apretado). Adoptan una disposición de relativa soltura en la que una buena parte de su superficie queda expuesta al medio acuoso del organismo, permitiendo así su interacción con otras moléculas. Una característica común de las moléculas de las diferentes variantes antigénicas de SEs (pero no de otras PTSAg) es la presencia de un bucle disulfuro dentro del dominio terminal-NH₂ que está implicado en las propiedades eméticas [Schlievert et al., 2000; Alouf y Müller-Alouf, 2003].



El término pirogénico hace referencia a su potencial para provocar fiebre, mientras que el término superantígeno (SAg) a su habilidad para estimular no específicamente a un número muy alto de linfocitos-T (colaboradores o CD4⁺) en el hospedador provocando la producción de citoquinas.

A diferencia de los antígenos convencionales, los SAg se unen a ciertas regiones de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC) de las células presentadoras de antígenos (APCs), fuera de la hendidura clásica de unión del antígeno, y concomitantemente se unen en sus formas nativas a los linfocitos-T colaboradores en puntos específicos de la región variable de la cadena beta (VB=Vβ) del receptor del linfocito-T (TCR) (Figura 3). Esta interacción da lugar a la activación (proliferación) de los linfocitos-T diana y esto produce *in vivo* o *in vitro* la liberación de

grandes cantidades de diversas citoquinas y otros efectores por parte de las células inmunes. Cada SAg interacciona específicamente con un particular grupo de motivos VB. De esta forma un SAg puede estimular al 30% de los linfocitos-T (CD4) a diferencia de un antígeno convencional que estimula a 1 de cada 10^5 - 10^6 [Alouf y Müller-Alouf, 2003].

La acción final del SAg se traduce en la producción y liberación por parte de los linfocitos-T, de niveles excesivamente altos de interleucina 2 (IL-2), que normalmente actúa a nivel local, pero que cuando existen grandes cantidades, puede llegar al torrente circulatorio produciendo una variedad de síntomas como náuseas, vómitos y fiebre, además de un exceso en la producción de otras citoquinas (como el factor de necrosis tumoral y el interferón alfa) lo que en casos extremos puede provocar *shock*, insuficiencia multiorgánica, y muerte [Mandell et al., 2000; Torres et al., 2001].

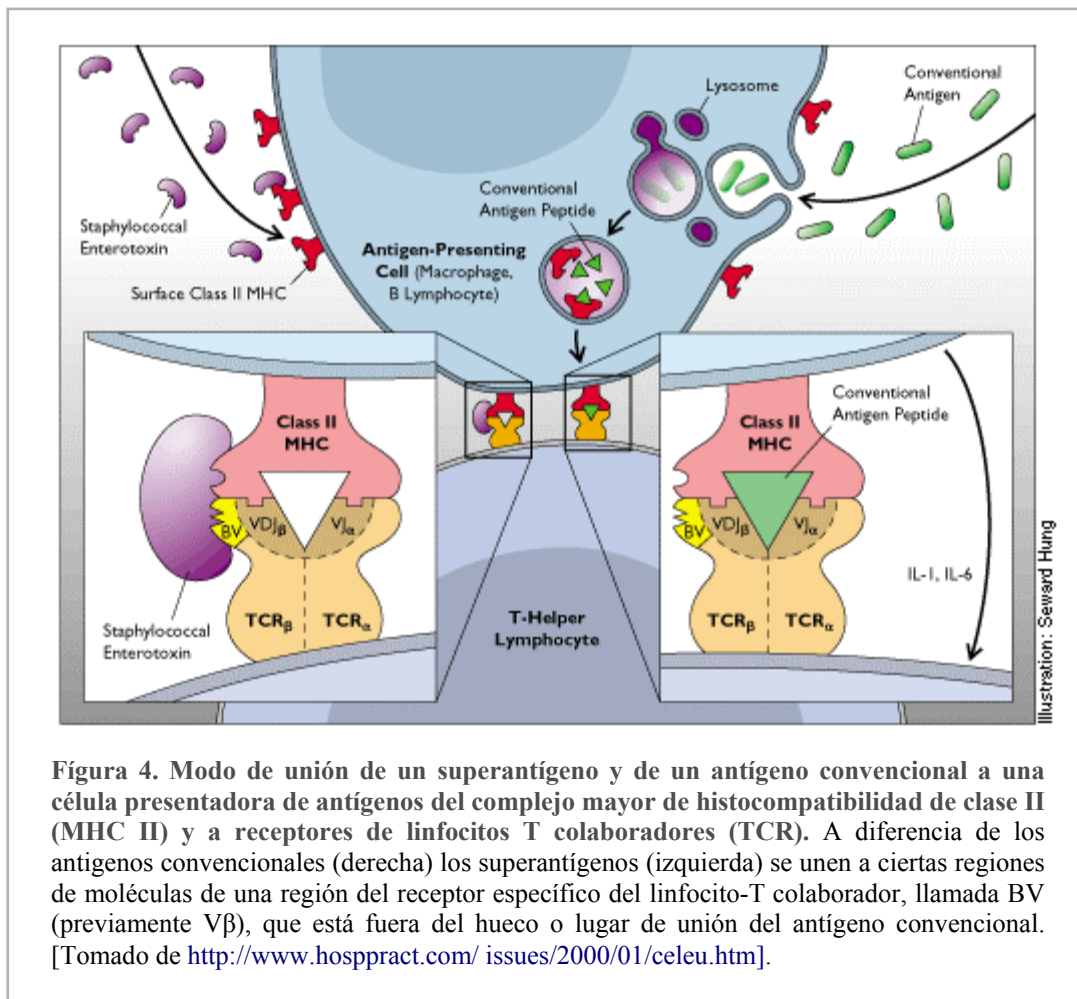


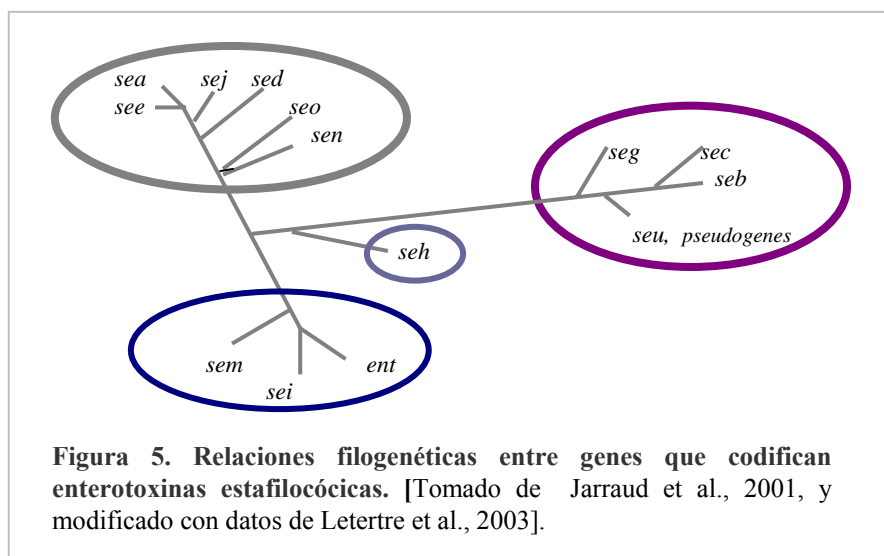
Figura 4. Modo de unión de un superantígeno y de un antígeno convencional a una célula presentadora de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y a receptores de linfocitos T colaboradores (TCR). A diferencia de los antígenos convencionales (derecha) los superantígenos (izquierda) se unen a ciertas regiones de moléculas de una región del receptor específico del linfocito-T colaborador, llamada BV (previamente V β), que está fuera del hueco o lugar de unión del antígeno convencional. [Tomado de <http://www.hospract.com/issues/2000/01/celeu.htm>].

Los SAGs proporcionan a las bacterias una estrategia para contrarrestar al sistema inmune del hospedador por lo menos de tres maneras: *a*) la generación de una respuesta inespecífica por parte del SAG dispersa la atención de la que habría sido una respuesta específica hacia el patógeno productor del SAG; *b*) la capacidad del SAG para provocar una sobreproducción de citoquinas puede inducir apoptosis específica en los linfocitos T que tengan los TCR sobre los que actúa el SAG; y *c*) la capacidad de inducir citotoxicidad celular dependiente de SAG podría eliminar células presentadoras de antígeno, no permitiendo de este modo la adecuada coestimulación de las células T. Esta última estrategia sugiere que se podría aprovechar a estos SAGs como vía terapéutica en el tratamiento de

enfermedades autoinmunes y en la erradicación de tumores que expresan moléculas CMH-II [Moriñigo, <http://www.encuentros.uma.es/encuentros44/superantigenos.html>].

Los SAGs han sido referidos como “el bueno, el feo y el malo” en alusión a los tres tipos de acción que pueden desempeñar relacionados con la respuesta inmune [Torres et al., 2001]. Así además de provocar fenómenos “feos” de toxicidad aguda por intoxicación alimentaria (SEs y en menor frecuencia TSST), la acción de los SAGs es relacionada con fenómenos “malos” por su implicación en casos de alteración de la respuesta inmune y de reactivación o aceleración de enfermedades de inmunodeficiencia (SIDA) o autoinmunes (esclerosis múltiple, la enfermedad de Kawasaki, o la alergia atópica). En este caso, experimentos con ratones han demostrado que la administración de SEA o SEB inducen una aceleración o reactivación de la enfermedad. Pero, además, los SAGs podrían llegar a desempeñar un papel “bueno” debido a su capacidad de generar una respuesta inmune deseada: aumentando la producción de determinados anticuerpos o también actuando de escudo protector contra el cáncer, debido a su intervención en terapias destinadas al establecimiento de una respuesta antitumoral. También en este caso, experimentos con ratones han probado que terapias combinadas de vacunas con células tumorales inactivadas y posterior tratamiento con SAGs fueron capaces de lograr el establecimiento de respuestas inmunes antitumorales en ratones sanos. En estos ensayos se logró más del 80% de supervivencia, prolongar la vida a toda la población (100%) y en algunos casos (20%) eliminar la presencia de tumores en ratones tratados con células tumorales activadas.

El grupo más numeroso y frecuente de PTSAg es el de las SEs. Hasta ahora (abril 2005), han sido reconocidas 18 SEs, serológicamente distintas, denominadas como A, B, C (con cinco variantes antigénicas C1, C2, C3 y C_{bovina} y C_{ovina}), D, E, G, H, I, (las tres últimas con variantes antigénicas) J, K, L, M, N, O, P, Q, R, y U, cada una de ellas es codificada por un gen que se denomina por el prefijo *se* seguido de la letra a la que corresponde la enterotoxina (*sea-seu*, inicialmente se denominaron *ent*). De algunos genes han sido encontradas diferentes variantes con pequeñas diferencias en la secuencia de nucleótidos, que se denominan con un número de orden detrás del gen [Balaban y Rasooly, 2000; Dinges et al., 2000; Jarraud et al., 2001, 2002; Orwin et al., 2002, 2003; Omoe et al., 2003a,b; Schmidt y Hensel, 2004]. Tanto las SEs como sus genes presentan diferente grado de homología, y se ha propuesto la organización de parte de los genes en cuatro agrupaciones o *clusters* (Figura 5).



La toxina inicialmente descrita como SEF [Bergdoll et al., 1981], no es una auténtica enterotoxina dado que no posee la capacidad biológica *in vivo* de las verdaderas SEs: no tiene efecto emético al carecer su molécula del bucle disulfuro y no es resistente a la pepsina. Por ser causante del SST ha pasado a denominarse TSST-1 (codificada por el gen *tst*). Al día de hoy se conocen las variantes ovina (TSSTov) cuya molécula difiere en 7 residuos de aminoácidos de la TSST-1; y la bovina (TSSTbov), que antigenicamente es igual a la TSST-1 humana pero el gen que la codifica difiere en 12 nucleótidos. Tanto SEs como TSSTs son termoestables y resistentes a la inactivación por proteasas. Las ETs (A, B, D de origen humano y C descrita en caballos) son antigenicamente diferentes pero comparten entre ellas propiedades biológicas y fisiopatológicas [Torres et al., 2001; Yamaguchi et al., 2002; Alouf y Müller-Alouf, 2003].

Presumiblemente, existen otros tipos de PTSAg pero está pendiente su identificación, conforme se secuencien -parcial o completamente- los genomas de nuevas cepas de *S. aureus* se describirán nuevos tipos. Por otro lado, está bien documentada la existencia de cepas con varios genes de PTSAGs. En algunos casos la presencia de varios genes (y producción de varias PTSAGs) es debida a su localización en un mismo elemento genético, en otros casos se debe a la acumulación de elementos genéticos diferentes en una misma célula bacteriana (próximo apartado).

1.2.1. Localización y organización de los genes que codifican PTSAGs: profagos, plásmidos e islas de patogenicidad

Actualmente, hay abundante información experimental sobre el soporte genético de muchos determinantes tanto de virulencia como de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas. Estos determinantes han sido adquiridos por las bacterias hospedadoras por procesos de transferencia horizontal en los que participan elementos móviles y por tanto variables (transposones, fagos y plásmidos) que, además, se encuentran formando parte de “guarderías” o “clusters” de genes. La secuenciación de genomas parciales y completos de *S. aureus* ha permitido conocer la organización de genes en diferentes islas de patogenicidad (PAI), que inicialmente se denominaron específicamente SaPI [revisado por Novick et al., 2001] y posteriormente vSa [Baba et al., 2002], donde “Sa” es abreviatura de *S. aureus*. Siguiendo la propuesta de denominación de Baba et al., 2002, se ha hecho una clasificación [Schmidt y Hensel, 2004] que con la adición de datos complementarios tomados de [Kuroda et al., 2001 y Gill et al., 2005] se resume a continuación:

i) **Familia de las vSa**, donde v significa “isla”, surge a partir del estudio comparativo del genoma de seis aislamientos de *S. aureus* que dio lugar a otras tantas subfamilias (vSa1, vSa2, vSa3, vSa4, vSa α , y vSa β). Las islas vSa1 a vSa4 contienen genes de integrasas (*int*), elementos que le confieren la movilidad (se pueden escindir espontáneamente del cromosoma) y están flanqueadas por sitios *att*, datos que muestran su origen y relación con bacteriofagos (Figura 6). Por el contrario vSa α y vSa β contienen genes que codifican transposasas, lo cual supone un claro indicio de la participación de transposones en el origen de las islas. Además, no se pueden escindir, lo cual es debido a la inactivación por delección parcial de los genes que codifican transposasas (Figura 7).

- **vSa1 - vSa4.** La designación de vSa1 fue sugerida para un grupo de islas previamente descritas como SaPI y que contienen clusters con genes SE y/o TSST-1 (Figura 6).
 - . vSa1, incluye SaPI1 (*tst, sek, sel'*) y SaPI3 (*seb, sek, seq*).
 - . vSa2 incluye SaPIbov (*tst-sec ± sel*) procedente de cepas de origen bovino.
 - . vSa3-tipo I, se encontró asociada a las cepas MRSA de origen nosocomial: MW2 y Mu50. El tipo II se encontró, también en MW2 y contiene *sel2, sec4 y ear*.

vSa4 incluye varias formas alélicas de cepas MRSA de origen nosocomial (Mu50, N315) previamente denominadas SaPI_n1 y SaPI_m1, así como la isla inicialmente descrita como SaPI₂- tipo I (de las cepas COL y MW2), portadoras de los genes *sel*, *sec3* y *tst*. La variante de tipo II carece de *tst*. En esta subfamilia se debe de incluir también SaPI₄ (Figura 6).

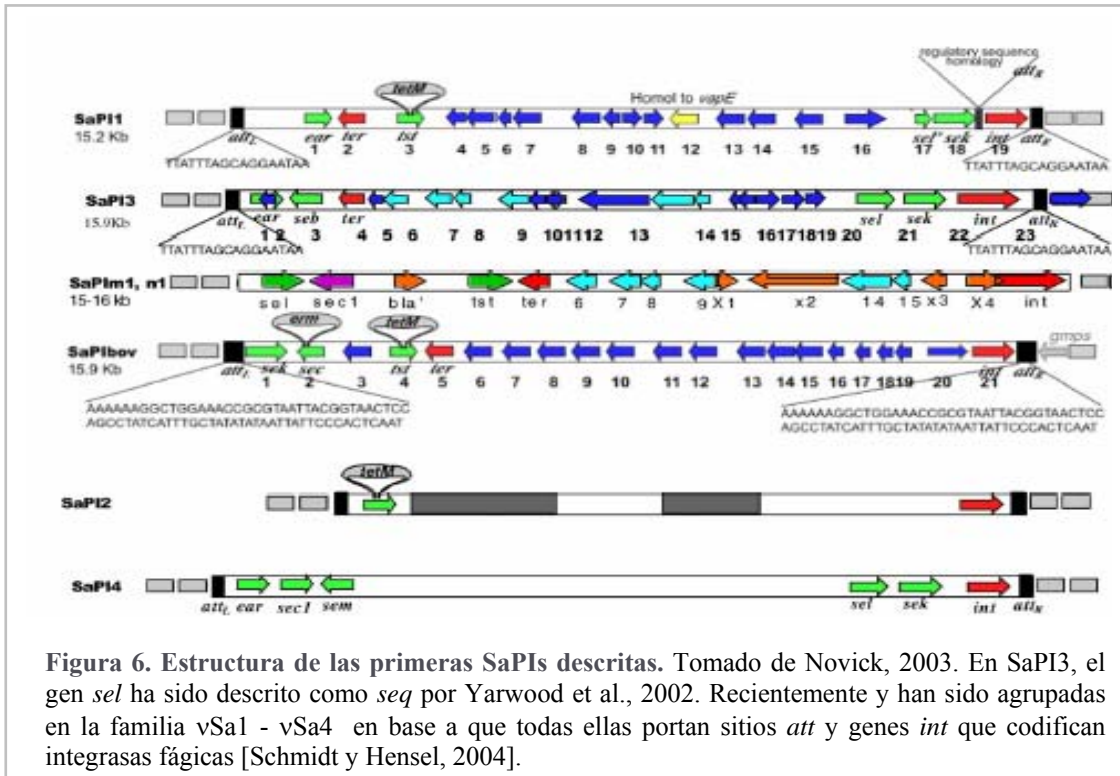


Figura 6. Estructura de las primeras SaPIs descritas. Tomado de Novick, 2003. En SaPI₃, el gen *sel* ha sido descrito como *seq* por Yarwood et al., 2002. Recientemente y han sido agrupadas en la familia vSa1 - vSa4 en base a que todas ellas portan sitios *att* y genes *int* que codifican integrasas fágicas [Schmidt y Hensel, 2004].

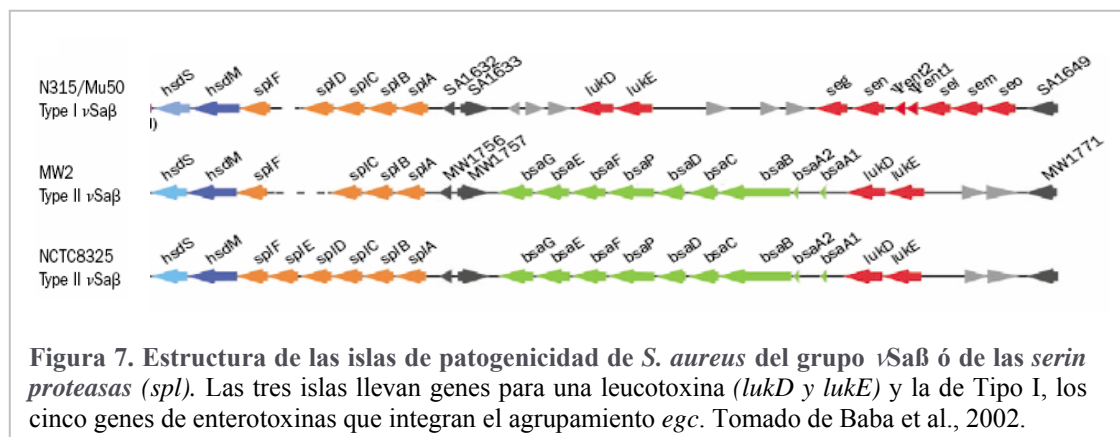


Figura 7. Estructura de las islas de patogenicidad de *S. aureus* del grupo vSa β ó de las *serin proteasas* (*spl*). Las tres islas llevan genes para una leucotoxina (*lukD* y *lukE*) y la de Tipo I, los cinco genes de enterotoxinas que integran el agrupamiento *egc*. Tomado de Baba et al., 2002.

- vSa α - vSa γ . Una o más islas de esta sub-familia están presentes en las seis cepas de *S. aureus* secuenciadas. Se caracterizan por tener un número variable de ORF de distintos tamaños.

vSa α , contiene 11 formas alélicas con genes *set* que codifican exotoxinas, y un cluster de genes de lipoproteínas.

vSa β , encontradas en cuatro genomas secuenciados (N315, Mu50, MW2 y COL) pero el tamaño y composición de genes es muy variable de un aislamiento a otro, tienen en común que llevan agrupaciones de genes de *serin-proteasas* (Figura 7). Las cepas N315 y Mu50 llevan la

variante “Tipo I” que contiene el operón *egc*, y los genes *lukE-lukD*. Mientras que la variante “Tipo II” lleva 9 genes de bacteriocinas (*bsa*) y *lukE-lukD*, estando presentes en las cepas MW2 y NCTC8325.

Tabla 3. Elementos genéticos que codifican PTSAs en *S. aureus*

TOXINA/gen	Elemento genético	Referencia ^a
TSST/ <i>tst</i>	SaPI1-2, φ Sa1, φ Sa4	Lindsay et al., 1998 Gill et al., 2005
SEA/ <i>sea</i>	Profagos	Novick, 2003 Gill et al., 2005
SEB/ <i>seb</i>	SaPI3 φ Sa1 Plásmido	Novick, 2003 Schmidt y Hensel, 2004 Yarwood et al., 2002
SEC/ <i>sec</i> ; (C ₁ , C ₂ , C ₃ , C _{bov})	Otro φ Sa2- φ Sa4, SaPI _n 1 y SaPI _m 1 SaPI _{bov} ; SaPI2; SaPI4 Plásmidos	Artículo 2 Schmidt y Hensel, 2004 Gill et al., 2005 Novick, 2003 Le Loir et al., 2003
SED/ <i>sed</i> -SEJ/ <i>sej</i> -SER/ <i>ser</i>	Otro Plásmidos tipo	Artículo 2 Bayles y Iandolo, 1989 Zhack et al., 1998
SED/ <i>sed</i> - <i>sej</i> - <i>ser</i> like	Plásmidos	Omoe et al., 2003
SEE/ <i>see</i>	pUO-SED3	Artículo 2
SEG, SEI, SEM, SEN, SEO/ <i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	Profago φ Sa β SaPI _n 3 y SaPI _m 3 Operon <i>egc</i>	Novick, 2003 Schmidt y Hensel, 2004 Gill et al., 2005 Jarraud et al., 2001
SEG, SEI, SEM, SEN, SEO, SEU/ <i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i>	Operón <i>egc</i> _{like}	Letertre et al., 2003
SEH/ <i>seh</i>	ND	Novick, 2003
SEK/ <i>sek</i>	φ Sa1 SaPI1, SaPI3 Profago	Schmidt y Hensel, 2004 Novick, 2003 Gill et al., 2005
SEL/ <i>sel</i>	φ Sa1, φ Sa4 SaPI _{bov} , SaPI4	Novick, 2003 Schmidt y Hensel, 2004
SEM/ <i>sem</i>	φ Sa β Operón- <i>egc</i> SaPI4, SaPI _n 3 y SaPI _m 3	Schmidt y Hensel, 2004 Jarraud et al., 2001 Novick, 2003
SEP/ <i>sep</i>	Profago	Gill et al., 2005
SEQ/ <i>seq</i>	φ Sa1 SaPI3	Schmidt y Hensel, 2004 Yarwood et al., 2002
TSST-1/ <i>tst</i> ; TSST _{bov} / <i>tst</i> _{bov}	SaPI1, SaPI2, SaPI _{bov} φ Sa1, φ Sa2, φ Sa4	Novick, 2003 Gill et al., 2005
ETA/ <i>eta</i>	Profago, φ Sa γ	Novick, 2003 Gill et al., 2005
ETB/ <i>etb</i>	Plásmido	Novick, 2003
ETD/ <i>etd</i>	<i>etd</i> SaPI	Schmidt y Hensel, 2004 Yamaguchi et al., 2002

^a Novick, 2003; Le Loir et al., 2003; y Schmidt y Hensel, 2004 son revisiones.

. *vSa_γ*, se ha encontrado en las cuatro cepas secuenciadas, lleva varios genes de exotoxinas (*set*), así como los genes *eta*, *hly*, y *phenol soluble modulin*.

- i) ***etd*-PAI**, posee los genes *etd* y *edin-B* [Yamaguchi et al., 2002]. Esta isla también aparece en cepas no asociadas a casos de infecciones exfoliativas, y no aparece en las cepas MRSA cuyo genoma ha sido secuenciado [Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002; Gill et al., 2005].

Los genes de las enterotoxinas SEA, SEE, SEK, SEP, SEG2, así como los de la leucotoxina PV, y de la exfoliatina ETA han sido asociados con distintos bacteriófagos lisogénicos ó profagos a los que se denomina Φ Sa, donde Sa indica *S. aureus* [Baba et al., 2002; Novick et al., 2001]. Recientemente, algunos autores han considerado a estos profagos como PAIs. [Gill et al., 2005].

- iii) **Familia de las SCC*mec*s**. Hace tiempo que se conoce que el gen de resistencia a la metilina, *mecA*, pertenece a un elemento genético insertado en el cromosoma de los estafilococos (SCC, *staphylococcus cassette chromosome*) que, además, porta secuencias de plásmidos, trasposones, elementos IS y otros genes de resistencia, variando de tamaño entre 20-60 kb. Diferentes versiones de SCC*mec* han sido secuenciadas y se conoce la organización de sus genes [Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002; Novick et al., 2001, Schmidt y Hensel, 2004; Gill et al., 2005].

I.3. Clasificación o diferenciación intraespecie: métodos de tipificación

S. aureus ha sido una de las primeras bacterias que ha requerido una subdivisión o diferenciación intraespecie, para ello se han desarrollado diferentes métodos de tipificación. La necesidad de tipificación ha estado en relación directa con su implicación en epidemias o brotes por fuente común tanto en infecciones hospitalarias, como en intoxicaciones alimentarias. Los métodos de tipificación permiten una clasificación intraespecífica de las bacterias, algo de gran utilidad en la investigación epidemiológica de cepas, linajes o clones patógenos para el hombre, puesto que nos ayuda a establecer relaciones entre las mismas (asociar un caso clínico con otro y casos con fuentes de infección). De esta forma, la aplicación de tales métodos proporciona información sobre la cadena epidemiológica (rutas de transmisión y reservorios), las posibles medidas de control, así como datos relevantes acerca de la evolución del patógeno en el espacio y el tiempo. Aislamientos bacterianos con idénticos resultados en varios métodos de tipificación se dice que pertenecen a una misma línea clonal, grupo genómico o linaje, aunque hayan sido obtenidos en diferente momento y lugar.

Los métodos de tipificación de microorganismos patógenos, aplicados a estudios epidemiológicos permiten el establecimiento de los linajes o las líneas clonales prevalentes y endémicas frente a los esporádicos y emergentes de una determinada especie microbiana en una determinada comunidad, país o región geográfica.

Los sistemas de tipificación y los caracteres que rastrean (o marcadores epidemiológicos) deben cumplir una serie de condiciones [Struelens et al., 1996, Mendoza y Landeras, 1999]:

- a. **Criterios de realización o primarios**. Estabilidad de las “marcas o caracteres” rastreados, incluso cuando el patógeno pasa de un hospedador a otro. Alta capacidad de tipificación (preferentemente el 100%). Reproducibilidad de los resultados en repetidas tipificaciones o ensayos. Alto poder de discriminación, siendo lo suficientemente sensible para distinguir organismos similares pero no idénticos y presentar un alto índice de discriminación (ID):

probabilidad de que dos organismos no relacionados de una población se sitúen en dos grupos distintos. Fácil interpretación de los resultados.

- b. Criterios de conveniencia o secundarios.** Aplicación amplia, a diferentes especies bacterianas. Equipo, materiales y reactivos disponibles y baratos. Rapidez, flexibilidad y facilidad de aplicación.

Además, todo método de nueva introducción ha de ser de valor probado basándose en investigaciones epidemiológicas, y concordante con otros métodos de tipificación en uso. Actualmente ninguno de los métodos propuestos cumple todas las premisas, con lo cual deben combinarse varios para caracterizar perfectamente una cepa.

Los métodos clásicos incluyen la biotipificación (biotipos según el hospedador preferente: humano, bovino, ovino, etc.) y la fagotipificación (susceptibilidad de infección por un juego de bacteriófagos). En las últimas décadas, el método más usual en los laboratorios de referencia ha sido la fagotipificación que se basa en la caracterización bacteriana en función de la susceptibilidad frente a la infección por un juego de bacteriófagos. El avance de los estudios en biología molecular ha permitido la introducción de métodos basados en el uso de técnicas electroforéticas para la separación de macromoléculas. Entre los métodos moleculares destacan los genéticos, que estudian el contenido en ADN, tanto cromosómico como plasmídico. Dado que el ADN es muy estable y la marca genética a rastrear es el genoma completo o una región concreta de ADN, los análisis a nivel genético gozan de mayor precisión que los fenotípicos. Además, pese a que su poder discriminatorio es variable, presentan otras dos ventajas a señalar: una alta reproducibilidad y una capacidad de tipificación del 100%, excepto el análisis de plásmidos. El empleo de estos métodos ha demostrado que cepas de *S. aureus* pueden estar muy distanciadas genéticamente [Tenover et al., 1995; Wei y Yang, 2000; Nagase et al., 2002; Murchan et al., 2003].

En los métodos de tipificación genotípicos podemos establecer una división en dos grupos: **los análisis de restricción y los análisis de amplificación**. En los **análisis de restricción** la comparación del genoma se lleva a cabo mediante el estudio del polimorfismo de los fragmentos de ADN generados *in vitro* por digestión con endonucleasas, y su posterior separación electroforética. Dentro de este grupo distinguimos entre aquellos métodos que emplean una electroforesis en campo constante (RFLP) o campo pulsante (PFGE). En ambos casos para la localización de regiones (ej. operones ADN_r), o secuencias concretas (genes de virulencia o metabólicos) del genoma se puede acudir a la hibridación con sondas específicas. Por otro lado, están las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, que pueden aplicarse en la amplificación de secuencias conocidas (perfiles de genes determinados) o aleatorias (RAPD): **análisis de amplificación**.

Los métodos genéticos utilizados y evaluados en el presente trabajo fueron: i) determinación del perfil de genes de toxinas mediante PCR; ii) detección de perfiles RAPD; iii) análisis de macrorrestricción del ADN genómico total y separación mediante PFGE; y iv) análisis de plásmidos. El fundamento y protocolo básico de todos ellos se recoge a continuación.

1.3.1. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción consiste en la amplificación o replicación enzimática *in vitro* de un fragmento de ADN, pudiendo llegar a copiarse 10^6 veces. Para ello son necesarios un ADN molde, desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs), una ADN polimerasa termorresistente y uno (para secuencias aleatorias) o dos (para secuencias conocidas) oligonucleótidos, de entre 10 y 20 pares de nucleótidos, complementarios a una región de la secuencia a amplificar. Estos oligonucleótidos reciben el nombre

de iniciadores, cebadores o *primers*, y tanto la elección de los mismos como la temperatura utilizada para su anillamiento (T_a) determinarán la especificidad de los fragmentos de ADN obtenidos [<http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>; Willians et al., 1990].

Se trata de un proceso cíclico que se compone de varias etapas que se recogen en la Figura 8. **Fase de desnaturalización:** durante la que se consigue la separación de las dos hebras del ADN molde, sometiendo la mezcla de reacción a una elevada temperatura. **Fase de unión o anillamiento:** la temperatura disminuye permitiendo que los iniciadores reconozcan y se unan a sus secuencias complementarias en las cadenas del ADN molde. **Fase de elongación:** la ADN polimerasa se une al iniciador y comienza la síntesis de una hebra complementaria gracias a la incorporación de nucleótidos. El ciclo se repite un número determinado de veces (alrededor de 30-35) con las cadenas recién sintetizadas actuando, también, como molde. Esta sucesión de ciclos da lugar a un incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN delimitado por los iniciadores.

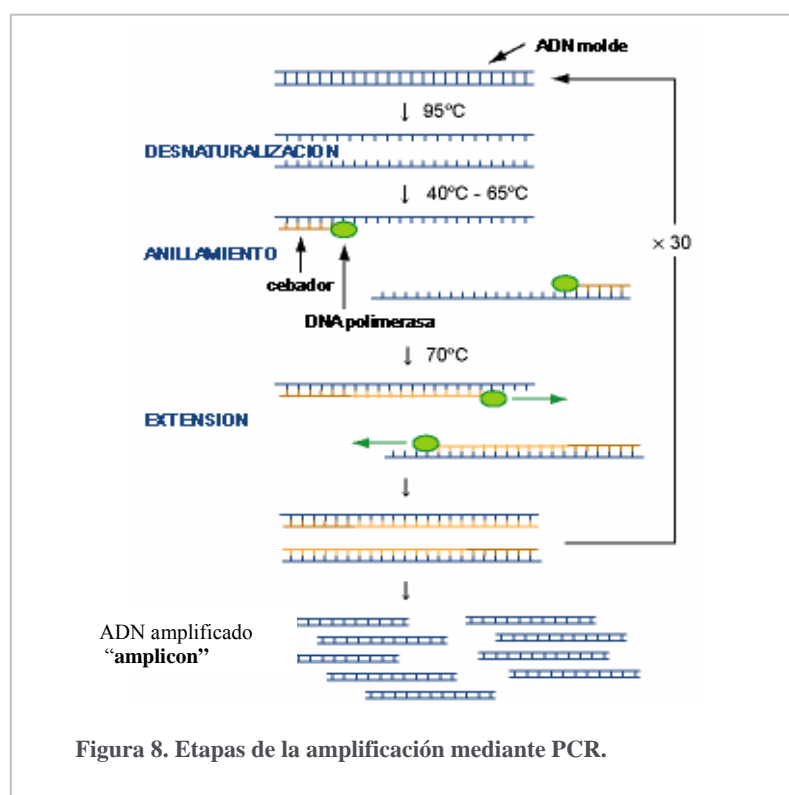
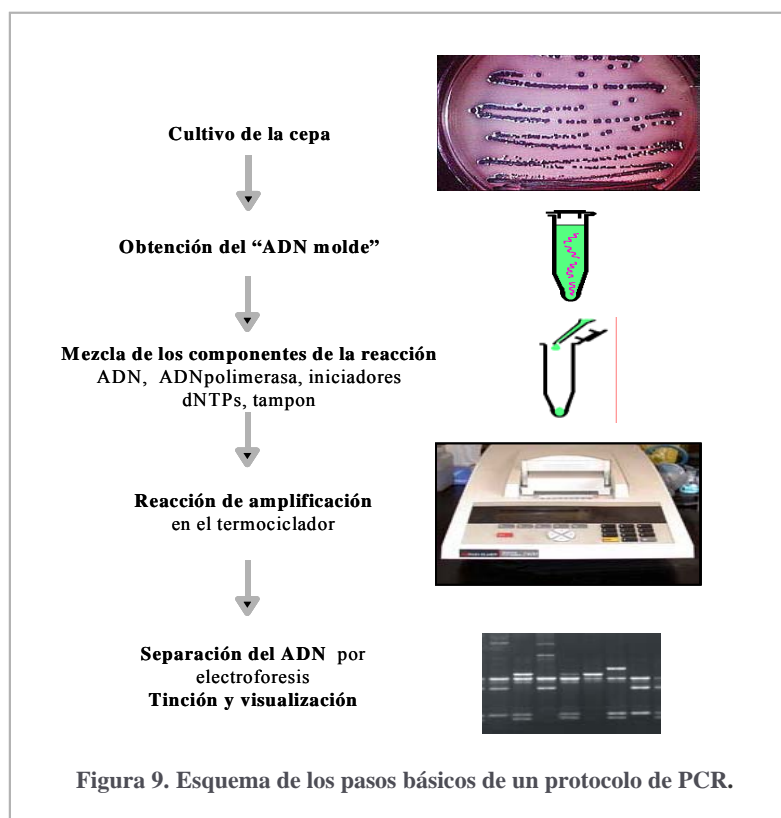


Figura 8. Etapas de la amplificación mediante PCR.

Posteriormente, se puede visualizar el patrón de bandas obtenido separando los fragmentos de ADN amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (BrEt), o en gel de poliacrilamida con tinción de plata o BrEt (Figura 9).

En función de la secuencia amplificada distinguimos dos variantes de esta técnica empleadas en tipificación: la amplificación de secuencias conocidas (monocopia o multicopia) y la amplificación de secuencias aleatorias (generalmente multicopia). En el presente trabajo se aplicaron procesos que son ejemplo de los dos tipos.



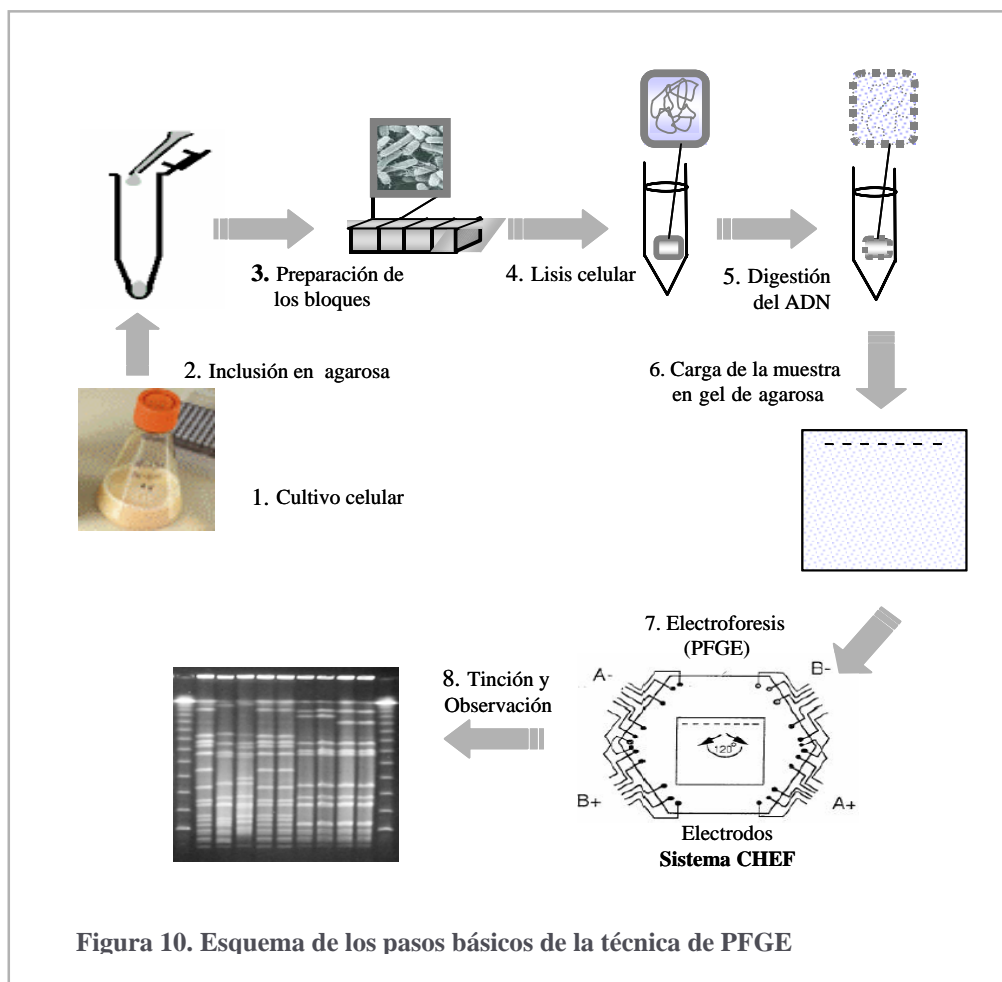
Amplificación de secuencias conocidas. Las secuencias rastreadas correspondían a genes que codifican diferentes tipos de toxinas (SEs, TSST-1, ETs, leucotoxinas y hemolisinas). Para ello se utilizaron secuencias conservadas de estos genes como iniciadores, algunas propuestas por otros autores y otras desarrolladas para este trabajo a partir de las secuencias depositadas en las bases de datos. Se aplicaron dos variantes: PCR-simple (se rastrea o busca un sólo gen o secuencia de ADN en la reacción) y PCR-múltiple (se rastrean varios genes utilizando varios pares de iniciadores en una misma reacción). En este caso hay que tener en cuenta la compatibilidad de las temperaturas de anillamiento y que los amplicones generados se puedan diferenciar basándose en su diferente tamaño [Mc Lauchlin et al., 2000; Martín et al., 2003].

Amplificación de secuencias arbitrarias, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). En esta técnica los productos de amplificación son secuencias multicopia aleatorias que forman parte de regiones del ADN con función desconocida. Se utilizan cebadores únicos y cortos (de 10 a 15 pares de bases), lo que hará que la reacción de polimerización ocurra en uno o más puntos desconocidos del ADN cromosómico. El conjunto de fragmentos obtenidos se pueden visualizar en geles de agarosa o poliacrilamida, y el número y tamaño de los mismos permiten la tipificación de las cepas y constituye su perfil-RAPD [Williams et al., 1990; Soto et al., 1999].

Esta técnica es simple y rápida, sin embargo es necesario encontrar el o los cebadores adecuados para generar perfiles bien definidos, diferenciables entre sí, reproducibles y útiles para comparar resultados de diferentes series. Sin olvidar la optimización de las condiciones a fin de evitar las amplificaciones inespecíficas y potenciar el poder de discriminación del método.

I.3.2. Electroforesis en campo pulsante (PFGE).

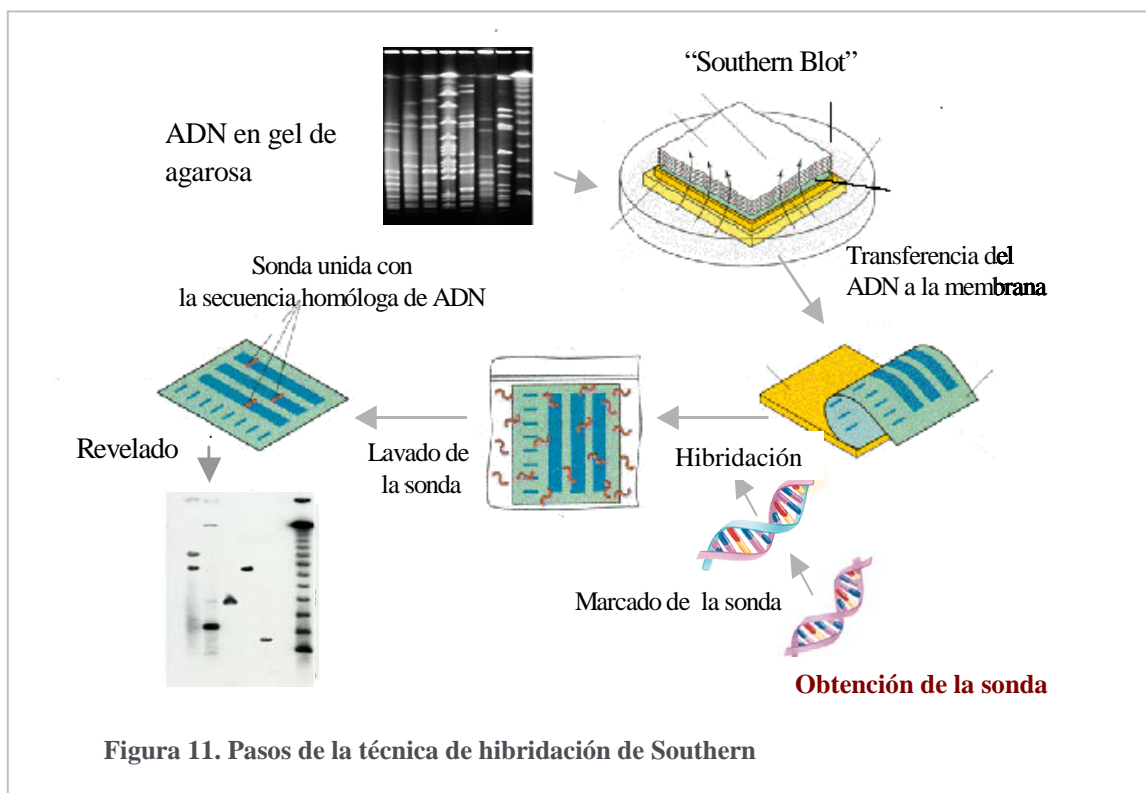
La PFGE se basa en la generación de patrones de fragmentos de restricción de gran tamaño, obtenidos al digerir el ADN de un organismo con endonucleasas de baja frecuencia de corte. Los fragmentos son separados mediante el procedimiento de electroforesis en campo pulsante. La variación de la secuencia de nucleótidos del ADN total de las distintas cepas queda revelada por el polimorfismo de los fragmentos generados (Figura 10). La técnica de PFGE-tipificación requiere ADN intacto, para ello las bacterias son embebidas en bloques de agarosa, lisadas *in situ* y digeridas con la enzima correspondiente, para *S. aureus* la endonucleasa de elección es *Sma*I, [Munchan et al., 2003]. Esta variante de la electroforesis en geles de agarosa permite separar los fragmentos de gran tamaño que se generan (la mayoría de ellos superan las 40 kb, longitud que rebasa el poder de resolución de la electroforesis tradicional) mediante la alteración cíclica del campo eléctrico. El resultado son perfiles de bandas discretas en el gel (PFGE-perfiles o tipos, o perfiles de macrorrestricción genómica), de tamaños comprendidos entre 1500 y 15 kb, y de fácil interpretación.



La reproducibilidad, buena resolución, el poder discriminatorio y, sobre todo, la estabilidad de los patrones conseguidos, es crucial para ser considerado un buen método de tipificación. Al día de hoy, y tras la elaboración de un protocolo consenso para su aplicación [Munchan et al., 2003] se debe de

considerar la PFGE con *SmaI* como el marcador genético de elección (*gold standard*). El alto potencial discriminatorio permite subdividir los aislamientos bacterianos en relación con posibles situaciones de brotes epidemiológicos.

Además de la determinación del polimorfismo del genoma o perfil de restricción genómico (perfil-PFGE) de una especie, esta técnica puede ser utilizada con otras aplicaciones como el cálculo del tamaño aproximado del genoma de un aislamiento y la localización o mapeo de plásmidos, transposones, genes, *loci*, etc, en los perfiles-PFGE, mediante hibridación con sondas específicas (Figura 11). El punto débil o inconveniente, es que resulta una técnica larga y laboriosa en su realización y que requiere de equipamiento y material de coste relativamente elevado.

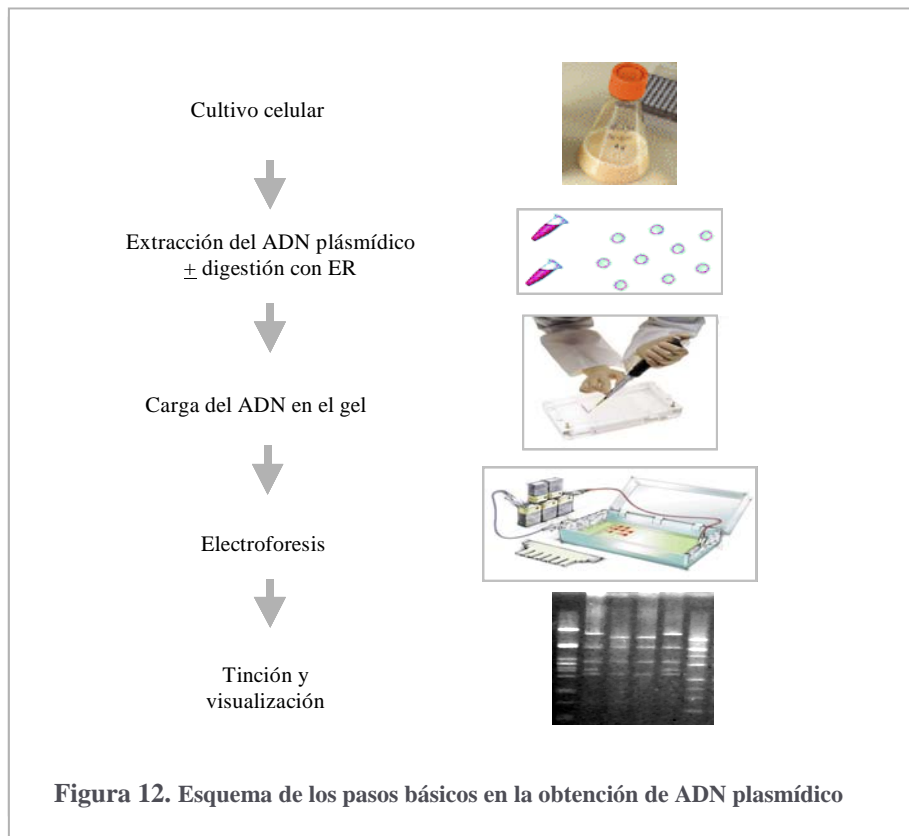


I.3.4. Análisis de plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómicas circulares con capacidad de replicación autónoma. Están presentes en un elevado número de bacterias y no son esenciales para el crecimiento normal de la bacteria huésped. Dado que los plásmidos portan genes metabólicos, de resistencia a antimicrobianos, de virulencia etc, pueden aportar a la bacteria huésped una ventaja para colonizar determinados ambientes. Unas veces serán ambientes defectivos en moléculas esenciales para la bacteria como aminoácidos, ácidos grasos, hierro..., pero ricos en macromoléculas (**plásmidos metabólicos**); otros pueden ser ambientes con sustancias antimicrobianas como antibióticos, antisépticos, metales pesados..., es el caso de los hospitales, granjas, y el propio cuerpo humano o animal cuando está sometido a tratamiento (**plásmidos de resistencia a antimicrobianos**); un tercer grupo lo constituyen las diferentes partes del cuerpo con diferentes ambientes y diferentes barreras biológicas y bioquímicas que tiene que evadir la bacteria para lo cual debe de poseer un arsenal de

factores de virulencia, tales como adhesinas, invasinas, sideroforos, exoenzimas, toxinas, mecanismos para evadir la fagocitosis, etc (**plásmidos de virulencia**) [Madigan et al., 2003].

El **perfil de plásmidos** vendrá dado por el número, peso molecular, así como por el patrón de restricción que nos proporcionará una información adicional de si plásmidos de semejante tamaño son o no iguales. Se trata de un método rápido, barato y sencillo, que requiere la extracción de ADN plasmídico, y cuyos pasos se recogen en la Figura 12.



El ADN plasmídico, unas veces entero y otras digerido con una o varias endonucleasas de restricción, se separa en geles de agarosa y una vez teñido con bromuro de etidio se visualiza bajo luz ultravioleta. Posteriormente, se pueden localizar, en los diferentes perfiles, secuencias de ADN correspondientes a genes específicos mediante hibridación [Sambrock y Russell, 2000; Mendoza y Landeras 1999; Zhang et al., 1998; Omoe et al., 2003].

Los plásmidos se pueden mostrar en tres formas moleculares: circular superenrollada, relajada (circular desenrollada) o abierta (lineal), y variaciones en los procedimientos de extracción o electroforesis pueden variar la proporción de las distintas formas [Sambrock y Russell, 2000]. Este hecho junto con la posibilidad de transferencia o pérdida de plásmidos, o delección de alguno de sus genes, constituyen las desventajas que presenta esta técnica. Como método de tipificación tiene un poder de discriminación variable, en función de si la especie es portadora usual de plásmidos o no, aunque llega a ser alto si se combina con otros métodos de tipificación.

I.3.5. Análisis de datos

Las guías consenso para el uso y evaluación de los sistemas de tipificación aplicables a estudios de epidemiología microbiana han sido recopiladas [Struelens et al., 1996].

Tamaño de los plásmidos y de los fragmentos de ADN. El cálculo del tamaño de los plásmidos y fragmentos de ADN se realiza de manera aproximada: se miden las distancias, respecto del pocillo de carga, de los fragmentos obtenidos comparándolas con las de los fragmentos control. El inverso de estas distancias se representa en una gráfica frente al logaritmo en base 10 del tamaño de las bandas, y se genera una recta patrón sobre la que se interpolan las distancias de migración de las moléculas de ADN problema.

Índice de discriminación (ID). Este parámetro nos da la probabilidad de que dos cepas no relacionadas, tomadas de la población analizada, se sitúen en diferentes grupos de tipificación y viene determinado por el número de tipos definidos por el método aplicado y la frecuencia relativa de estos tipos. Se calcula por el índice de diversidad de Simpson, con la siguiente ecuación:

$$ID = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

N= número total de cepas en la muestra
s= número total de tipos descritos
n_j= número de cepas pertenecientes al tipo j

Determinación de los tipos genéticos y análisis filogenético. El análisis de convergencia genética entre diferentes tipos se lleva a cabo mediante la determinación del grado de similitud entre perfiles de bandas generadas por cada cepa. Cuando se hace de forma manual, no se tienen en cuenta los tamaños de las bandas que forman el perfil, se codifica la presencia o ausencia de bandas en el perfil, como 1 o 0 respectivamente. Los datos se procesan utilizando programas como el MVSP (Multivariate Statistics Package for PCs) [RockWare Inc^R, www.rockware.com] aplicando un coeficiente de similitud genética, como el coeficiente de Dice (da mas valor a los fragmentos comunes o alineados) o el coeficiente de Jaccard (da mas valor a los fragmentos no alineados).

El coeficiente de Dice expresa la proporción de fragmentos de ADN compartidos entre dos perfiles, y se calcula aplicando la fórmula:

$$F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

n_x = número total de bandas del perfil x
n_y = número total de bandas del perfil y
n_{xy} = número de bandas comunes a los dos perfiles

El coeficiente de Jaccard expresa la proporción de fragmentos de ADN no compartidos entre dos perfiles, y se calcula aplicando la fórmula:

$$J_{c_{xy}} = a / (a + b + c)$$

a = número de bandas comunes a los dos perfiles
b = número de bandas presentes en x pero no en y
c = número de bandas presentes en y pero no en x

A partir de coeficientes de similitud, y aplicando los correspondientes algoritmos de agrupamiento, se pueden elaborar dendogramas en los que se muestra la similitud genética entre tipos. Actualmente existen equipos de lectura automática que incorporan un programa informático (*software*) capaz de interpretar los resultados obtenidos y realizar los correspondientes dendogramas.

II. OBJETIVOS

En esta tesis doctoral nos planteamos aplicar y evaluar diferentes técnicas de Microbiología Convencional y Genética Microbiana al estudio de *S. aureus*, de origen no clínico, con potencial para causar un tipo de enfermedad transmitida por alimentos: la intoxicación estafilocócica. En una primera fase intentamos establecer relaciones entre aislamientos toxigénicos (productores de alguna/s de las cuatro enterotoxinas clásicas SEA-SED y/o de TSST) de origen humano, procedentes de muestras nasales de portadores sanos, con alimentos elaborados manualmente y dirigidos a consumo humano. En una segunda fase el trabajo se extendió al rastreo de genes de otras toxinas (enterotoxinas, exfoliatinas y leucotoxinas) la mayoría de ellos de nueva descripción, y se incluyeron aislamientos de leche de vacas con mastitis subclínica.

Los resultados más relevantes, junto al material y métodos utilizados, se presentan en la forma de los artículos científicos en que han sido recogidos y publicados. Con objeto de hacer una exposición coordinada en la discusión general de los resultados, los puntos estudiados se han agrupado en cuatro objetivos. Cada objetivo se ha desarrollado -principalmente- en uno o dos artículos, aunque en determinadas ocasiones, se han relacionado resultados de más de dos de los artículos.

OBJETIVO 1. Establecer relaciones toxigénicas y genómicas entre *S. aureus* aislados de muestras nasales de portadores sanos y de alimentos manualmente procesados. Determinar la localización cromosómica y/o plasmídica de los genes de las enterotoxinas A-D y de la toxina del síndrome del shock tóxico.

ARTÍCULO 1. Fueyo, J.M., M.C. Martín, M.A. González-Hevia, M.C. Mendoza. 2001. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 67: 139-145.

ARTÍCULO 2. Fueyo J.M., M.C. Mendoza, M.C. Martín. 2005. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes and Infection* 7: 187-194.

OBJETIVO 2. Aplicar y evaluar métodos genéticos al diagnóstico microbiológico de brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus*.

ARTÍCULO 3. Martín, M.C., J.M. Fueyo, M.A., González-Hevia, M.C. Mendoza. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* 94: 279-86.

OBJETIVO 3. Hacer una primera aproximación a los tipos más frecuentes o endémicos de *S. aureus*, con toxinas pirogénicas superantígenos de nueva descripción, en portadores nasales de Asturias.

ARTÍCULO 4. Fueyo J.M., M.C. Mendoza, M.A. Alvarez, M.C. Martín. 2005. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiology Letters* 243: 447-454

OBJETIVO 4. Determinar los genotipos de exotoxinas en aislamientos de *S. aureus* asociados con mastitis subclínica en vacas. Establecer relaciones entre genotipos de virulencia y tipos genómicos y entre aislamientos de origen humano y bovino.

ARTÍCULO 5. Fueyo, J. M., M.C. Mendoza, M.R. Rodicio, J. Muñoz, M.A. Alvarez, M.C. Martín. 2005. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles in *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows, and relationships with macrorrestriction genomic profiles. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1278-1284.

ARTÍCULO 6. Fueyo, J.M, M.R. Rodicio, M.C. Mendoza, M.C. Martín. Human and bovine constitute reservoirs of different sub-populations of *Staphylococcus aureus* in possession of the highly prevalent enterotoxin gene cluster *egc*_{like}. In *Recent Advances in Multidisciplinary Applied Microbiology (2005). Understanding and Exploiting Microbes and their Interactions. Biological, Physical, Chemical and Engineering Aspects.* Proceedings Book of BioMicroWord 2005. *En prensa.*

III. ARTÍCULOS



Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins

J.M. Fueyo^a, M.C. Martín^{a,b}, M.A. González-Hevia^b, M.C. Mendoza^{a,*}

^a Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería s/n. 33006 Oviedo, Spain

^b Laboratorio de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Principado de Asturias, Carretera del Rubín s/n. 33001 Oviedo, Spain

Received 30 July 2000; received in revised form 19 October 2000; accepted 28 December 2000

Abstract

A total of 224 *Staphylococcus aureus* strains from human carriers (110 strains) and manually handled foods (114 strains) collected in the Principality of Asturias, Spain over 1995–1999 were analysed for the production of enterotoxins (SEs) A, B, C, and D by a reversed passive latex agglutination test and by amplification of *ent* genes (A, B, C, D, E, and J) using PCR. Sixty-two strains were enterotoxigenic and a good relation between detection of SEs and their *ent* genes was found. No strain carried *entE* and all strains producing SED carried *entD* and *entJ* genes. Among the enterotoxigenic strains the percentages registered were 29, 8, 35, 18, 2, 2, and 6 for SEA, SEB, SEC, SEDJ, SEAC, SEADJ and SECDJ, respectively. DNA fingerprinting of 77 strains (the SE prototypes, 62 enterotoxigenic and 10 non-enterotoxigenic [NE]) was carried out by randomly amplified polymorphic DNA using two selected primers independently. Combining results from both primers, 10 genetic types were defined, which showed a different degree of relationship (similarity coefficient: 0.9–0.36) and were clustered into three lineages. One lineage clustered five genetic types and a wide diversity of strains, mainly SEA, SEB, SEDJ, and NE. Another lineage clustered only SEC, SECDJ and NE strains. These two lineages showed a low genetic relationship and appeared as endemic in healthy humans living in the Principality of Asturias. The third lineage included only the prototype strains for SEA and SEE. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxins; RPLA test; PCR; DNA fingerprinting; Healthy carriers; Foods

1. Introduction

Staphylococcus aureus colonisation of food has long been associated with a form of gastroenteritis

that is clinically manifested by vomiting and abdominal cramping with or without diarrhoea. This condition is called staphylococcal food poisoning and results from the ingestion of one or more pre-formed staphylococcal enterotoxins (SEs) on food that has been contaminated with some species of staphylococci, primarily *S. aureus* (Jay, 1992; Mossel et al., 1995). It has been reported that staphylococcal food intoxication is one of the most common causes

* Corresponding author. Fax: +34-985-103-148.
E-mail address: camf@sauron.quimica.uniovi.es
(M.C. Mendoza).

of food poisoning in many countries (Jay, 1992; Wieneke et al., 1993; Su and Wong, 1997; Rosec et al., 1997; Dinges et al., 2000). In Spain, data on outbreaks only have been registered by the “Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica” and *S. aureus* has appeared in recent years as the second most frequent agent involved of the reported and confirmed food-borne disease outbreaks (Hernandez et al., 1995).

SEs are a group of single-chain, low-molecular-weight proteins known to have potent emetic characteristics, potent effects on immune system cells and are also known to be pyrogenic. They are similar in composition and biological activity but are identified as separate proteins due to their differences in antigenicity. Several serologically distinct SEs have so far been recognised, being labelled from A to J, and their genes as *entA* to *entJ* (Mossel et al., 1995; Su and Wong, 1997; Jarraud et al., 1999; Zhang et al., 1998; Dinges et al., 2000). Toxic shock syndrome toxin 1 was mistakenly designated SEF and thus there is no serotype F enterotoxin. Minor antigenic variants of SEC (SEC_{1,2,3}) have been described as well as two distinct SEH (Su and Wong, 1997; Dinges et al., 2000). It is not uncommon for strains to secrete more than one SE, and it is noteworthy that the genes encoding SED (*entD*) and SEJ (*entJ*) are carried by a single type of penicillase-plasmid of *S. aureus* (Zhang et al., 1998).

Intraspecies differentiation of *S. aureus* is essentially designed for epidemiological investigations during outbreaks, or as part of an ongoing surveillance system, and it can be carried out by phenotypic and genetic procedures (Tenover et al., 1994). Such methods are based on the premise that clonally related organisms share traits that can differentiate them from other unrelated organisms. Nowadays, there are many different methods for bacteria typing, but not all the methods divide groups of strains in a similar fashion and each method shows differences in the performance and convenience criteria. The present study was designed to determine the frequency and types of the enterotoxigenic *S. aureus* strains from two groups of samples—human, and manually handled foods—collected in the Principality of Asturias, Spain. The relations between the secretion of the four most common enterotoxins (A, B, C and D) detected by a reversed passive latex

agglutination, the presence of six genes (*entA*, B, C, D, E and J) detected by PCR, and the genetic types assessed by DNA amplification fingerprinting of *S. aureus*, were analysed.

2. Material and methods

2.1. Sources and strains of *S. aureus*

The 224 *S. aureus* strains included in this study were collected from the nasal cavities of healthy carriers (90), superficial wounds (20), cheeses (52), cakes (43), and other manually handled foods (19) in our and other Microbiology Laboratories of the Principality of Asturias, Spain, over a 5-year period (1995–1999). In all the assays, five prototype strains for the production of SEs (*S. aureus* ATCC 13565-SEA, ATCC 19095-SEC, ATCC 23235-SEDJ, ATCC 27664-SEE, and CECT 4459-SEB) were used as positive controls; and *S. aureus* ATCC 9144 non-enterotoxigenic (NE) was used as the negative control.

To confirm that the strains were *S. aureus* each of these was cultured on two selective media (Baird–Parker–agar and Mannitol–salt agar; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England); tested by thermonuclease (on DNase test agar; Oxoid), coagulase and specific antigens using the “Slidex Staph-kit”, and biochemically identified by the “API Staph system” (both from Bio Merieux, Marcy-l’Etoile, France).

2.2. Detection of enterotoxigenicity

The types of enterotoxins produced by *S. aureus* were determined by the use of the SET-RPLA-kit (Staphylococcal enterotoxin A, B, C, D detection kit by reversed passive latex agglutination; Oxoid) following the manufacturer’s suggestions. For the detection of staphylococcal *ent* genes, a polymerase chain reaction (PCR) method was carried out, using selected and specific primers for *entA*, B, C, D, E and J genes (Becker et al., 1998; Zhang et al., 1998; Martín et al., 1998); using 15 µl of a 10-fold distilled water dilution of a Luria Bertani broth overnight culture or 100 ng of purified DNA as template. PCR protocols were performed for individual genes by using only one primer pair for each tube. Temperature cycling was controlled in a Perkin-Elmer Gene Amp. PCR System (Mod. 2400 and 9600) pro-

grammed as follows: initial cycle of 95°C for 5 min; followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 10 min.

2.3. DNA extraction and genome typing by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

Total DNA was extracted using 2 × Kirby lytic mix according to Hopwood et al. (1985). Genome fingerprinting was performed by RAPD using 100 ng of template DNA, with the amplified conditions as described (Martín et al., 1997), and two selected primers, labelled S (5'-TCACGATGCA-3') (Williams et al., 1990; Soto et al., 1999) and C (5'-AGG-GAACGAG-3') (Lin et al., 1996; Soto et al., 1999). These primers were selected from among a set of primers because they generated the most accurate (reproducible and well separated DNA amplified bands) RAPD profiles from DNA samples of the *S. aureus* prototype strains for the production of SEs cited above. Amplified band profiles were defined by the presence or absence of well reproducible bands at particular positions on the gel. The similarity between band profiles generated by each RAPD procedure or a combination of both was calculated by a Dice coefficient (*S*) as proposed (Struelens et al., 1996). The combined numerical analysis of the different banding profiles revealed by each primer was performed by an unweighted pair group average method using a software package as previously described (Mendoza et al., 1996). The discrimination index (DI), i.e. the probability that two unrelated strains obtained from the population would be placed into different typing groups was calculated as proposed in Struelens et al. (1996).

3. Results and discussion

3.1. Enterotoxin producing strains of *S. aureus*

In a first step, the *S. aureus* strains collected from human and food samples were studied for the production of the most frequent types of enterotoxins using the SET-RPLA kit as well as for their genes by a PCR method. Up to 28% (62 out of 224) of the strains generated positive agglutination with one or two sera and all of them contained *ent* genes as

determined by the PCR method. All strains were tested at least twice to ensure the results, and a good relation between the detection of SEs and their *ent* genes was found. ATCC 23235-SEDJ and the 16 strains that produced SED carried *entD* and *entJ* genes. No strain amplified the *entE* gene while ATCC 27664-SEE generated the expected amplicon with the *entE*-primers and was agglutination-negative with the four sera assayed.

The frequency of enterotoxigenic strains, the serological types of SEs, and the relations between enterotoxins and sample origin are compiled in Table 1. From the SE results and the results presented in Table 2, the following facts could be noted. (i) Only the 16 strains that produced SED carried *entJ* in addition to *entD*. Of these, four strains also produced SEC and one strain produced SEA. (ii) SEC was the most frequent (27 strains, 44% of the enterotoxigenic strains); the second and third most frequent were SEA (20 strains, 32%) and SEDJ (16 strains, 26%). These SEs were present alone or in the following three combinations: SEAC, SEADJ, and SECDJ. (iii) SEA was more frequent among human than among food strains (15 vs. 5); conversely, SEDJ was less frequent among human than among food strains (6 vs. 10); SEC was found in similar frequency in both types (15 vs. 12) but only in human strains in combination with other SEs, and SEB appeared in low frequency in both types of strains.

Different works have reported extremely variable results for the frequency of SEs among staphylococcal strains as well as the fact that SEA is the most frequent among strains from human sources including strains causing food poisoning and SEC among strains of bovine origin (Mossel and van Netten, 1990; Valle et al., 1990; Jay, 1992; Wieneke et al., 1993; Lehn et al., 1995; Tsen et al., 1997). However, Rosec et al. (1997), found that *S. aureus* strains collected from foodstuffs in France and ascribed to human biovar origin were most often enterotoxigenic and that SEC was the predominant type. Data from the present study also showed that *S. aureus* strains directly collected from human specimens of healthy carriers and manually handled foods more commonly produced SEC compared to other SEs. Moreover, these manually handled foods were mainly cheeses and cakes elaborated with cow's milk and beef-based dishes.

Table 1
Enterotoxigenic *S. aureus* from different samples. Relations between enterotoxins and sample origin

Sample origin	SES/TS (%)	Enterotoxins: no. (%)						
		A	B	C	D	AC	AD	CD
<i>Human 32 / 110 (29)</i>								
Nasal cavity	28/90 (31)	12 (43)	2 (7)	8 (29)	1 (4)	1 (4)		4 (14)
Skin wound	5/20 (25)	2 (40)		2 (40)	1 (20)			
<i>Foods 29 / 114 (25)</i>								
Cheeses	8/52 (15)	1 (12)	2 (25)	5 (62)				
Cakes	16/43 (38)	2 (12)	1 (6)	3 (19)	9 (56)		1 (6)	
Others	5/19 (26)	1 (20)		4 (80)				
Total	62/224 (28)	18 (29)	5 (8)	22 (35)	11 (18)	1 (2)	1 (2)	4 (6)

SES/TS, enterotoxigenic strains/total strains.

3.2. DNA fingerprinting of *S. aureus*. Relations between genetic types and enterotoxins

In a second step, the 77 *S. aureus* strains included in Table 2 (6 prototypes for SEs, 62 enterotoxigenic

and 9 non-enterotoxigenic) were typed by RAPD in order to test whether SE positive strains are genetically clustered. All experiments were carried out at least twice to ensure the reproducibility of the results and only the reproducible and well-defined frag-

Table 2
Distribution of *S. aureus* strains into lineages and genetic types. Relations between genetic types, enterotoxins/*ent* genes, and source of origin

Lineage: genetic type (no. strains)	Enterotoxins/genes (no. strains)	Source of the strains (no. strains)					
		Foods			Human carriers		Control strains
		Cheeses	Cakes	Others	Nasal	Wound	
1: S1 C1 (38)	A/ <i>entA</i> (12)	1	2	1	6	2	
	B/ <i>entB</i> (6)	2	1		2		CBCT 4459
	C/ <i>entC</i> (4)		2	1			ATCC 19095
	D/ <i>entDJ</i> (10)		8		1	1	
	A,C/ <i>entAC</i> (1)				1		
	AD/ <i>entADJ</i> (1)			1			
	NE (4)			3			ATCC 9144
1: S3 C1 (2)	D/ <i>entDJ</i> (2)		1				ATCC 23235
1: S5 C1 (3)	NE (3)		2		1		
1: S6 C1 (3)	A/ <i>entA</i> (1)				2		
	NE (2)				1		
1: S7 C1 (5)	A/ <i>entA</i> (4)				4		
	NE (1)				1		
2: S4 C3 (21)	C/ <i>entC</i> (17)	5	1	3	8		
	CD/ <i>entCD</i> (4)				4		
2: S4 C4 (2)	C/ <i>entC</i> (2)					2	
2: S2 C2 (1)	A/ <i>entA</i> (1)						ATCC 13565
3: S4 C2 (1)	E/ <i>entE</i> (1)						ATCC 27664
3: S4 C5 (1)	NE (1)		1				

(1) Lineage as defined from the cluster analysis shown in Fig. 2; (2) S1–S7 RAPD profiles obtained with primer S (Fig. 1), C1–C5 RAPD profiles obtained with primer C (Fig. 1).

ments were selected to define amplicon profiles (these fragments are labelled “a to j” in Fig. 1, panels A and B). With primer S, seven amplified DNA band profiles (S1–S7) were differentiated. These profiles included between one and four reproducible and well-defined fragments, all of them categorised as mismatching or polymorphic. Profiles S1 and S4 were clearly the most frequent (49% and 40% of the total series and 52% and 37% of the Asturian enterotoxigenic strains). With primer C, five amplified DNA band profiles were differentiated (C1–C5), which included 2–5 fragments. Only one fragment was categorised as matching, and nine as mismatching. Profiles C1 and C3 were the most frequent (66% and 27% of the total series, and 63% and 34% of the Asturian enterotoxigenic strains, respectively).

The criteria for evaluating typing methods described by Struelens et al. (1996) have been applied to the RAPD procedures used in this work. The typeability (100%), accessibility of materials and reagents, flexibility (RAPD can be used in different bacteria species), rapidity and ease of performance are all important advantages. The discrimination power of RAPD with primers S and C revealed seven types (DI = 0.67) and five types (DI = 0.49), respectively. The combination of results from the

two procedures increased the number of types to 11 (DI = 0.68). It should be pointed out that RAPD procedures showed a total reproducibility in distributing strains into profiles, revealing themselves as adequate tools for epidemiological purposes. Nevertheless, the reproducibility and interpretation of amplicon banding profiles are shortcomings due to the fact that weak and not constant bands are frequently detected and this makes it necessary to choose the fragments that define each profile. In a previous work, in which RAPD was also performed with primers S and C (Soto et al., 1999), it was commented that variations in RAPD profiles obtained in different laboratories could be found, but that each laboratory is free to establish which amplified fragments are considered in order to define profiles.

The number of matching and mismatching fragments (generated by one or both primers) reveals the degree of genetic similarity between amplicon profiles (between 16% and 90% among individual profiles and 36% and 90% among combined profiles). The heterogeneity found between amplicon profiles could be used as an approach to the heterogeneity or degree of genetic relationship among the *S. aureus* strains analysed. In this work, organisms showing identical amplicon profiles were considered to be closely related and members of a single genetic type, and 10 genetic types were defined (Table 2). In addition, a combined numerical analysis of the different banding profiles revealed by each primer was performed. The resulting similarity dendrogram showed that different groupings could be observed when varying the levels of similarity (Fig. 2). For example, organisms generating identical amplicon profiles with primer C but different ones with primer S (51 strains assigned to five genetic types) were grouped into a cluster or lineage 1 at a level of $S = 0.60$. Conversely, at this level, organisms generating identical amplicon profiles with primer S but different ones with primer C (four genetic types) fall into two other clusters or lineages 2 and 3. Three of these genetic types (including 24 strains) formed lineage 2 ($S = 0.75$); while the fourth, S4C2 (represented only by ATCC 27664 SEE), together with the genetic type S2C2, represented only by ATCC 13565 SEA, formed lineage 3.

The distribution of *S. aureus* strains into genetic types, and the relations between these with SEs and

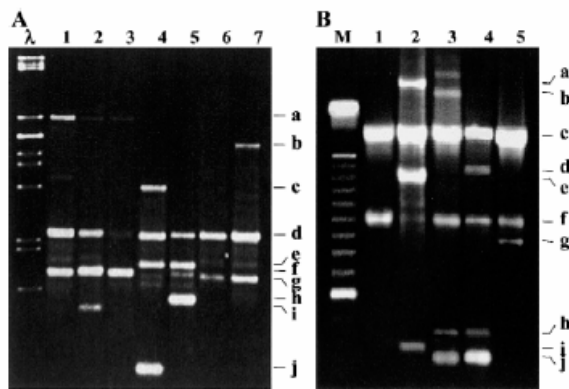


Fig. 1. Amplified band profiles generated by *Staphylococcus aureus* strains. Panels (A) and (B), seven and five profiles generated with primers S and C, respectively. Lane λ: phage λ DNA digested with *Pst*I: sizes of fragments (bp) from top to bottom are 5.1, 4.6, 4.5, 2.8, 2.5, 2.1, 2.0, 1.7, 1.2, 1.1, and 0.8. Lane M, molecular size marker (100-bp DNA ladder, Gibco BRL). Sizes of fragments (bp) from top to bottom are 2000, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, and 600. The distribution of *S. aureus* strains into RAPD profiles is shown in Table 2.

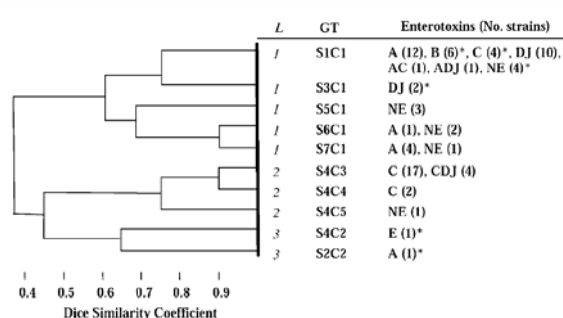


Fig. 2. Dendrogram obtained from cluster analysis of amplified band profiles of *Staphylococcus aureus* strains. Each branch represents a combined amplicon-profile or genetic type. * Includes prototype strain for this enterotoxin. L: lineage, GT: genetic type as defined by RAPD as shown in Fig. 1.

their genes, and with the source of origin of the strains are compiled in Table 2. It is noteworthy that the most frequent genetic type, S1C1, included a great diversity of strains (SEA, SEB, and SEDJ from food and human samples; SEADJ, SEC and NE from foods; and SEAC from humans; as well as the control strains CECT 4459-SEB, ATCC 19095-SEC, and ATCC 9144 NE). The second most frequent, S4C3, included only SEC collected from both food and human samples and SECDJ collected only from human nasal samples. It is well known that SEDJ are plasmid-encoded (Zhang et al., 1998). The finding that some SE positive and some SE negative strains generated identical or similar amplicon-profiles suggests that SE positive strains do not belong to a specific genetic class.

Other epidemiologically interesting observations concerning the Asturian strains were: (i) the enterotoxigenic strains were discriminated into only five genetic types, each being represented in a different frequency: S1C1 (52%), S4C3 (34%), S7C1 (6%), S4C4 (3%) and S6C1 (2%); (ii) SEA (alone or together with SEC or SEDJ), SEB, and NE strains belonged to genetic types falling into lineage 1; (iii) SEC (alone or in combination with SEDJ) was produced mainly by strains (23 of out 27) belonging to two close types falling into lineage 2; (iv) SEDJ when produced alone or together with SEA belonged to strains falling into lineage 1, whereas when produced together with SEC the strains always fall into lineage 2; (v) healthy people living in the Principality of Asturias are a reservoir of enterotoxigenic *S.*

aureus organisms belonging to two genetic lineages, the first associated mainly with the production of SEA, SEB and SEDJ and the second with SEC. Both types appeared as endemic in the region because they were represented by organisms collected from human carriers and manually handled foods over 1995–1999.

Data from the present investigation support the fact that *S. aureus* typing by RAPD, using selected primers, could be employed as an effective tool for different epidemiological purposes. For example, it will be of use for determining whether the previously recognised specific enterotoxigenic genetic types are present in a set of new isolates, for identifying the new or emergent genetic types in a region or setting and for studying their spread, and finally for recognising and identifying the source of strains of staphylococcal infection in outbreaks and sporadic disease incidents.

Acknowledgements

We thank Prof. F. Uruburu, Prof. F. Vázquez and Dr. C. Gonzalez de los Reyes for the *S. aureus* strains (prototype of enterotoxins, human and cheese strains, respectively).

References

- Becker, K., Roth, R., Peters, G., 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2548–2553.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16–34.
- Hernandez, G., Mangas, I., Mateo, S., Tello, O., Rotaecche, V., 1995. Vigilancia de brotes de infecciones e intoxicaciones de origen alimentario. España. Año 1994. *Bol. Epidemiol. Semanal* 3/30, 293–299.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Charter, K.F., Kiese, T., Bruton, C.J., Kiesre, H.M., Lidiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*. John Innes Institute, Norwich, UK.
- Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J., Lina, G., 1999. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2446–2449.

- Jay, J.M., 1992. Staphylococcal gastroenteritis. Modern Food Microbiology. 4th edn. Van Nostrand, New York, pp. 455–478.
- Lehn, N., Schaller, E., Wagner, H., Krönke, M., 1995. Frequency of toxic shock syndrome toxin- and enterotoxin-producing clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14, 43–46.
- Lin, A.W., Usera, M.A., Barret, T.J., Goldsby, R.A., 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. J. Clin. Microbiol. 34, 870–876.
- Martín, M.C., González-Hevia, M.A., Moro, I., Mendoza, M.C., 1997. Genetic typing method applied to the differentiation of clonal lines among *Salmonella enterica* serogroup G strains causing human salmonellosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 19, 215–221.
- Martín, M.C., Gonzalez-Hevia, M.A., Gutiérrez, F., Moro, I., 1998. Detección de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de enterotoxinas en alimentos por técnicas de PCR. XI Congreso Nacional de Microbiología de los alimentos. Universidad Pública de Navarra, Spain.
- Mendoza, M.C., Martín, M.C., González-Hevia, M.A., 1996. Usefulness of ribotyping in a molecular epidemiology study of shigellosis. Epidemiol. Infect. 116, 127–135.
- Mossel, D.A.A., van Netten, P., 1990. *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxigenesis, control and monitoring. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 69, 123–145.
- Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., Baird, R.M., 1995. Essentials of the Microbiology of Foods. Wiley, New York, pp. 147–150.
- Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C., Richard, N., 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. Int. J. Food Microbiol. 35, 213–221.
- Soto, S.M., Guerra, B., González-Hevia, M.A., Mendoza, M.C., 1999. Potential of a three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method within twelve *Salmonella* serotypes. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4830–4836.
- ESGEM, Struelens, M.J., Bauernfeind, A., Van Belkum, A., Blanc, D., Cookson, B.D., Dijkshoorn, L., El Solh, N., Etienne, J., Garaizar, J., Gerner-Smidh, P., Legakis, N., de Lencastre, H., Nicolas, M.H., Pitt, T.L., Römmling, U., Rosdahl, V., Witte, W., 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect. 2, 2–11.
- Su, Y.-C., Wong, A.C.L., 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. J. Food Prot. 60, 195–202.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hébert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M., Pfaller, M.A., 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 32, 407–415.
- Tsen, H.-Y., Yu, Gk., Lin, I.-T., 1997. Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods. J. Food Protect. 58, 147–153.
- Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A., Vadillo, S., 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1323–1326.
- Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilbert, R.J., 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–1990. Epidemiol. Infect. 110, 519–531.
- Williams, J.G.K., Kubelin, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531–6535.
- Zhang, S., Iandolo, J.J., Steward, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227–233.

Available online at www.sciencedirect.com

Microbes and Infection 7 (2005) 187–194

Microbes and Infection

www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings

José M. Fueyo^a, M. Carmen Mendoza^a, M. Cruz Martín^{a,b,*}^a Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, C/Julián Clavería no. 6, 33006 Oviedo, Spain^b Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), 33300-Villaviciosa, Asturias, Spain

Received 18 May 2004; accepted 18 October 2004

Available online 05 January 2005

Abstract

A set of 269 *Staphylococcus aureus* isolates recovered from nasal carriers and manually handled foods in a region of Spain was analyzed for pyrogenic toxin production and toxin genes. Fifty-seven isolates producing at least one of four enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED), 10 isolates producing only toxic shock syndrome toxin (TSST-1), and 10 isolates producing both toxin types were found. The 77 toxigenic isolates were discriminated into 36 *Sma*I genomic and 13 *Eco*RI plasmid profiles. A strong relationship between toxin profiles with both *Sma*I genomic and *Eco*RI plasmid profiles was revealed. *Sma*I genomic profiles showing six or less mismatching fragments and similarity coefficient ≥ 0.7 were included in a lineage. Eight lineages were differentiated; six of them grouped both human and food isolates and two of these also included outbreak-implicated isolates. Two lineages, represented by TSST-SEA and TSST-1, on the one hand, and SEC and SEC-SED isolates, on the other hand, were the most frequent, but only the second was outbreak-related. When *Sma*I genomic and *Eco*RI plasmid profiles were hybridized with *tst*, *sea*, *seb*, and *sec* toxin probes, it was observed that each probe mapped on a different *Sma*I fragment from isolates falling into the same lineage. All of the probes only mapped on genomic fragments, but *sed* also mapped on three plasmid fragments. When *sej* and *ser* probes were included, they mapped together with *sed* on the chromosome and on the plasmids. Two plasmids (ca. 33 and 36 kb) carried the expected *sed-sej-ser* genes, while the other (ca. 53.5 kb) carried *sed-sej* and *ser*-like genes. The latter plasmid and the chromosomal location of *sed-sej-ser* are new findings from this study.

© 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxins; TSST-1; PFGE; Plasmids; Toxin genes

1. Introduction

Staphylococcus aureus causes a wide variety of infections, from simple abscesses to fatal sepsis, plus toxinoses

such as food poisoning and toxic shock syndrome. The symptoms of food poisoning in humans are mainly due to the secretion of emetic and pyrogenic toxins named staphylococcal enterotoxins (SEs). These toxins are single-chain proteins, and today, at least those designated SEA to SEE, SEG to SER, and SEU have been identified [1–7]. A further staphylococcal exotoxin involved in toxic shock syndrome toxin (TSST-1) was initially designated SEF [8] but does not have the “in vivo” biological activities of true SEs. Both SEs and TSST-1 are superantigens, which have the ability to stimulate large populations of T cells with a particular V β element of the T-cell receptor [1–3,7,9,10]. These toxins are encoded by genes associated with mobile (and therefore variable) genetic elements, such as prophages, *S. aureus* pathogenicity islands (SaPIs), and plasmids [2–7,11,12]. In humans, the primary habitat of *S. aureus* is the mucous membrane of the nasophar-

Abbreviations: DI, discrimination index; E1 to E13, *Eco*RI profiles numbers 1–13; L1 to L8, *Sma*I lineages numbers 1–8; LMUO, Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Oviedo; PA, Principality of Asturias; PCR, polymerase chain reaction; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; PRPs, plasmid restriction profiles; pUO-SED, plasmid of University of Oviedo-*Staphylococci* Enterotoxin D; S1 to S36, *Sma*I profiles numbers 1–36; SaPIs, *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands; SEA, SEB, SEC and SED, staphylococcal enterotoxins A, B, C, and D, respectively; TSST-1, toxic shock syndrome toxin.

* Corresponding author. Tel.: +34 985 10 2738; fax: +34 985 10 3148.

E-mail addresses: mcm@fq.uniovi.es (M.C. Martín), mcm@ipla.csic.es (M.C. Martín).

1286-4579/\$ - see front matter © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.micinf.2004.10.009

ynx, where it exists as a persistent or transient member of the normal microbiota without causing any symptoms. Organisms present in the nose may contaminate the hands; nasal carriers can thus become skin carriers, and these microorganisms can therefore be easily transmitted into manually handled foods. When colonizing food, some *S. aureus* excrete SEs that can cause poisoning after the ingestion of contaminated food. It also applies to cooked food due to the thermoresistance of the SEs [1,2,4,13].

This study was performed in a set of *S. aureus* isolates recovered from nasal carriers and manually handled foods in the Principality of Asturias (PA), Spain, in order to answer questions such as (i) what is the proportion of isolates producing the main serological types of toxins, SEA to SED and TSST-1, or carrying their genes? (ii) are the toxigenic isolates genetically homogeneous or heterogeneous? (iii) does a correlation exist between toxin profiles and genetic types traced by macrorestriction genomic analysis? (iv) do toxin genes located in the chromosome and/or in plasmids conform with the reported data? (v) could the obtained information be useful for epidemiological and genetic purposes?

2. Materials and methods

2.1. Isolates and sources of isolation

The 269 isolates analyzed in this study were collected from the nasal cavities of healthy carriers (138 isolates, one from each carrier) and manually handled foods (131 isolates), including dairy products (cheeses, creams and ice creams), cakes, raw meats, and stuffed foods (catering, and cooked foods suspected of poisoning) (Table 1). All nasal isolates were randomly selected from the isolate collection conserved in the University of Oviedo's Microbiology Laboratory (LMUO). They were collected from healthy adults, mainly students from different courses and disciplines, over the period 1996–2002. Food isolates were collected at this and other food microbiology laboratories from the PA during the same time period. Only seven of the food isolates were collected in outbreak investigations [14], five of them being SE-positives (Table 1). An epidemiological relationship between human and food isolates included in this study was not identified. The isolates recovered between 1996 and 1999 were tested for SEs by immunoassay and by conventional and multiplex polymerase chain reaction (PCR) procedures in previous works [15,16]. In both toxin production tests and genetic assays, the following *S. aureus* strains were used as controls: CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 976 SEA-prototype (ATCC 13565), 4459 SEB-prototype, 4465 SEC-prototype (ATCC 19095), 4466 SED-prototype (ATCC 23235), 59 SE-negative (ATCC 9144), and LMUO TSST-prototype. CECT 4466 was also used in plasmid analysis [5,12], and NCTC 8325 in pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis [17]. Statistical analysis between human

and food isolates was performed using the two-sample tests of 'independent proportions' (software: Stata 6.0., Stata Corporation, TX, USA). Differences between groups were considered statistically significant if *P* values were ≤ 0.05 .

2.2. Detection of SEs and TSST-1 by immunoassay and by PCR

The production of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and TSST-1 was determined by reversed passive latex agglutination using two commercial kits, SET-RPLA and TST-RPLA (Oxoid, Hampshire, UK), according to the manufacturer's recommendations. The presence of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *sej*, *ser* and *tst* genes was screened by PCR. The primers for the first five genes were reported in [16]. Genes were designed for the *tst* (*tst*-1: AGCATCTACAAACGATAATATAAAGG and *tst*-2: CATTGTTATTTTC CAATAACCACCCG) and *ser* (*ser*-1: AAACCAGATCCAAGGCCTGGAG and *ser*-2: TCA-CATTGTAGTCAGGTGAACCTT). The last two primer pairs were designed from the sequences reported in GenBank (accession number AP003135) and [5], and they generated amplicons of 481 and 700 bp, respectively. The PCR conditions have been described previously [16].

2.3. PFGE-macrorestriction and plasmid analysis

Whole DNA from each *S. aureus* isolate was analyzed by PFGE-macrorestriction performed with *Sma*I by means of the CHEF-DRIII SYS220/240 (Bio-Rad Laboratories, S.A., Madrid, Spain) using the recommended protocol [17]. In the first step, *Sma*I banding profiles (*Sma*I profiles) were visually analyzed, and their presence or absence was recorded for each band scored. In a second step, DNAs from isolates generating similar *Sma*I profiles were run together in the same gel. *Sma*I profiles showing one or more mismatching fragments were considered different, and those with ≤ 6 or less mismatching fragments were included in a visual grouping [17,18]. The discrimination index (DI) (i.e. the probability that two unrelated isolates obtained from the population would be placed into different *Sma*I profiles) was calculated by using Simpson's index of diversity [19]. Initially, the *Sma*I profiles were numbered according to the date of isolation of the first strain generating the profile, but for this paper they were grouped and relabeled according to the toxin or toxins produced (Fig. 1). In a third step, the similarity between the *Sma*I profiles shown in Fig. 1 was analyzed according to the 'unweighted pair method with arithmetic averages' (UPGMA) and Dice's similarity coefficient (*S*) (software: SPSS for Windows 10.01.SPSS Inc., 1999). The *S* values clustering *Sma*I profiles into lineages are indicated in Fig. 1.

Plasmid content was determined by the alkaline lysis method with lysostaphin (Sigma, St. Louis, USA) [20], followed or not by digestion with *Eco*RI and *Hind*III (Takara, Shuzo Co., Ltd., Japan) according to the manufacturer's protocol. In both cases, after electrophoresis, the agarose gels were stained with ethidium bromide and visualized by UV

Table 1
Toxicogenic and genetic types of *S. aureus* collected from human carriers and manually handled foods

TOXIN/gene (no. isolates)	SmaI		Plasmids EcoRI/plasmid	Source (no. isolates)		Isolation years
	Profile	Lineage		H	F: food type	
SEA + TSST-1 (10)	S2	L1	–		1: stuffed food	1997
	S3a	L1	–	4		1999–2002
	S3b	L1	E2	1		1997
	S4	L1	–	1		2001
	S5	L1	–	1		1997
	S6	L1	–		1: cream-milk	1997
	S7	L1	–		1: cake	1999
SEA + <i>tsf</i> (4) ^a	S3a	L1	–	4		1999–2002
TSST-1 (10)	S8	L1	–	3		1998
	S9	L1	–	2		2001
	S10	L2	–		1: stuffed food	1997
	S11	L2	–	2		1998–2002
	S12	L2	–		1: cake	1999
	S13		–	1		
SEA (9)	S14	L3	E3	2	2 ^c : stuffed foods	2002
	S16	L3	–, E2	1	2: cake, cheese	1997–1999
	S17		E4	1		1998
	S18		E5	1		2002
SEA + SEC (2)	S15	L3	E1	2		1998–1999
SEB (8)	S21	L4	–		2: cheeses	1996
	S22	L4	E7		1: cake	1997
	S23	L4	E6	1		1997
	S24	L4	E6	1		2002
	S25		–	1		2001
	S26 ^b	L5	E8	1		2001
	S27 ^b	L5	E8	1		2001
SEC (21)	S31a	L6	–, E9	5	10 ^d : stuffed foods cream-cake, cheeses	1996–2002
	S32	L6	–	1		1999
	S33	L6	–	1		2001
	S34	L6	–		2: cake, stuffed food	1997
	S35		E10		1: cake	1997
	S36		–		1 ^e : stuffed food	2002
	SEC + SED (3)	S31b	L6	E11/pUO-Sa-SED2	3	
SED (9)	S41	L7	E12/pUO-Sa-SED3		2: cakes	1997
	S42	L7	E13/pUO-Sa-SED1	2		2002
	S43	L8	E13/pUO-Sa-SED1		3: cakes	1997
	S44	L8	E13/pUO-Sa-SED1		1: cake	1997
	S46	L8	E13/pUO-Sa-SED1		1: cake	1997
SEA + SED (1)	S45	L8	E13/pUO-Sa-SED1		1: cake	1997

H: human carriers; F, manually handled foods; –, plasmid-free.

^a Four SEA isolates carried the *tsf* gene but were TSST-1-negative by TST-RPLA.

^b The *seb* probe did not map on resolvable fragments of these profiles.

^c Each group includes two outbreak-isolates (strains), and each strain was implicated in a different food poisoning outbreak and recovered from several and different foods. The four outbreaks occurred at different time and place [14].

^d Each group includes two outbreak-isolates (strains), and each strain was implicated in a different food poisoning outbreak and recovered from several and different foods. The four outbreaks occurred at different time and place [14].

^e Isolate (strain) implicated in one food poisoning outbreak.

light illumination. Isolates were considered plasmid-free when plasmid extractions were negative at least twice. For the accurate calculation of the molecular size of the plasmids, total DNA embedded in agarose plugs was treated with 8 U of nuclease S1 (Amersham Biosciences) at 37 °C for 45 min, and separated by PFGE [21]. The PFGE running conditions were the same as for PFGE fingerprinting [17]. Plasmid restriction profiles (PRPs) were labeled with the first letter of the endonuclease used and followed by Arabic numerals,

depending on the order of detection. Plasmids encoding SED were named plasmid of University of Oviedo-Staphylococci Enterotoxin D (pUO-SED) followed by an order number.

To map genes encoding SEs and TSST-1, *Sma*I genomic profiles as well as *SI*, *Eco*RI and *Hind*III plasmid profiles were transferred to membranes and hybridized with selected probes. The probes were obtained from control strains by PCR and labeled by the commercial procedure “PCR DIG labeling mix” (Roche Diagnostics, Spain).

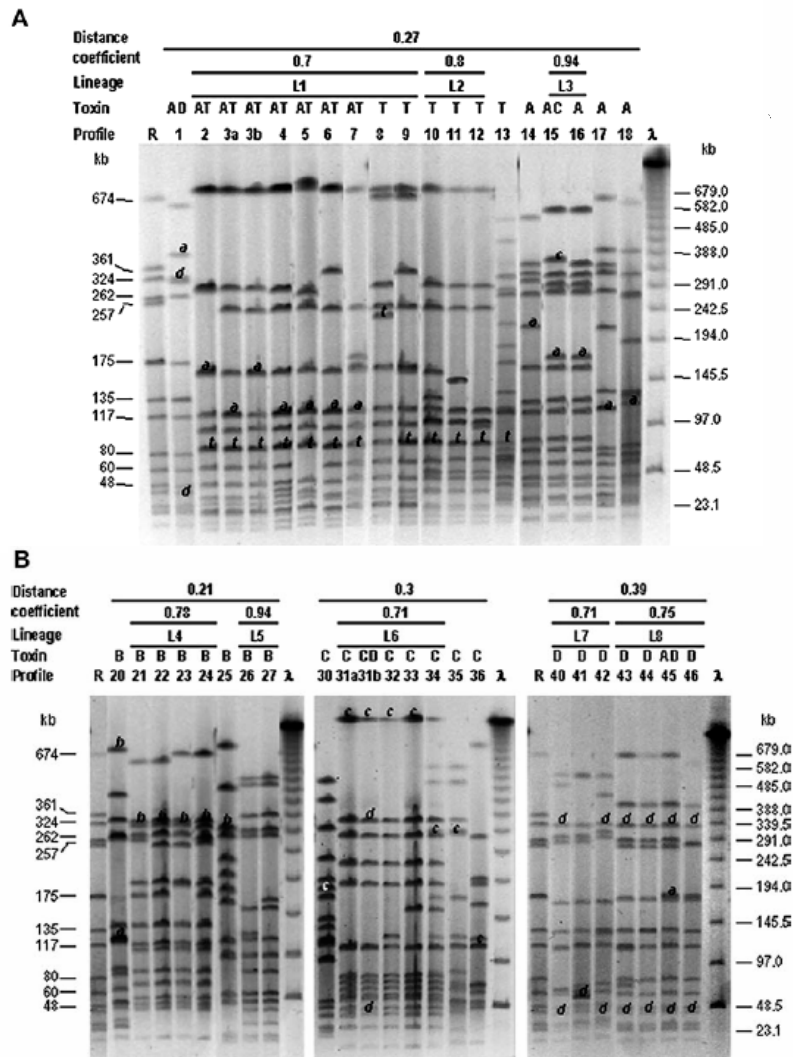


Fig. 1. *SmaI* PFGE analysis of toxigenic *S. aureus*.

Lanes λ, Lambda ladder PFGE marker (New England Biolabs). Lane R, NCTC 8325 used as both PFGE- and SE/TSST-negative control. It lacks the 208-kb fragment present in the PFGE profile shown in [17]. Lanes 1, 20, 30 and 40 show the *SmaI* profiles generated by the prototype strains, SEA (CECT 976), SEB (CECT4459), SEC (CECT 4465) and SED (CECT4466), respectively. The remaining lanes show *SmaI* profiles generated by *S. aureus* isolates collected from human carriers and manually handled foods. Horizontal lines cluster *SmaI* profiles with Dice's similarity coefficient \geq than the indicated value. The italic letters *a*, *b*, *c*, *d*, and *t* indicate the fragments in which the *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst* probes, respectively, mapped. In all fragments in which *sed* mapped, *sej* and *ser* probes also did so. The distribution of isolates into profiles is shown in Table 1.

3. Results

3.1. Detection, characterization and frequency of toxigenic *S. aureus* isolates collected from nasal carriers and manually handled foods

Among the 269 *S. aureus* isolates tested for SEs and TSST-1 by reversed passive latex agglutination, 57 (21.2%), 10 (3.7%) and 10 (3.7%) were, respectively, positive for SE, TSST-1 or both (Table 1). When these isolates were tested by PCR for the presence of toxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst*), it was found that each isolate carried the gene(s) expected

for the produced toxin(s). However, four SEA (*sea*) isolates, which carried the *tst* gene, were TSST-1-negative using the TST-RPLA assay. The five toxins screened were found at different frequencies and in different toxin profiles. SEA and SEC (each with 26 isolates, 9.7%) were the most frequent. SEA was found either alone (nine isolates) or together with TSST-1 (10 isolates, with a further four containing the *tst* gene but not producing the toxin, see above), SEC or SED (two and one isolates, respectively), being more frequent among human than food isolates (16 vs. 10; statistically non-significant, $P = 0.1006$). SEC mainly appeared alone (21 isolates) and in a minority of cases together with SED and SEA

(with three and two isolates), and it gave a similar frequency in both human and food isolates (12 vs. 14), but only appeared with other SEs in human isolates. Third most frequent was TSST-1/*tst* (24 isolates, 8.9%, including the four *tst*-positives) appearing alone (10 isolates) or together with SEA (14 isolates), and like the latter, it was more frequently found in human than in food isolates (21 vs. 3; statistically significant, $P = 0.0001$). Fourth most frequent was SED (13 isolates, 4.8%) being found alone (nine isolates) or with SEA or SEC (one and three isolates, already cited). The least frequent was SEB (eight isolates, 3%), which always appeared alone. The controls CECT 976-SEA and 4459-SEB, in addition to the toxins for which they are prototypes, also produced SED and SEA, respectively.

3.2. PFGE-macrorestriction analysis of genomic DNA of toxigenic *S. aureus* collected from nasal carriers and foods

When the 77 isolates producing SEs and/or TSST-1 were tested by *Sma*I macrorestriction, all of them were found typeable. In order to define *Sma*I profiles, only fragments larger than ca. 25 kb were considered, ranging between 11 and 18 fragments in a specific and distinctive profile resolvable under this criterion. In total, 36 *Sma*I profiles (Fig. 1) could be differentiated, with the seven control SE strains generating seven additional *Sma*I profiles (Figs. 1 and 2). This procedure yielded DI = 0.94 and 0.93, including and not including the control strains, respectively.

Using two criteria, number of mismatching fragments (≤ 6) and similarity coefficient ($S \geq 0.7$), several profiles were clustered into groupings considered as lineages. Eight lineages (L1–L8) and seven non-clustered *Sma*I profiles were identified (Fig. 1), displaying a different frequency and correlating with specific toxins or toxin profiles. Six lineages included both human and food isolates (Table 1), and between them

the most frequent (L1 and L6) included isolates collected between 1996–1997 and 2002. L1 clustered eight *Sma*I profiles represented by 10 SEA/TSST-1, four SEA (that also carried the *tst* gene) and four TSST-1 isolates. Within L1, the S3 profile was the most frequent, including nine isolates, five SEA/TSST-1 and four SEA/*tst*. L6 comprised four *Sma*I profiles represented by 17 SEC and three SEC-SED isolates. One profile, S31, was clearly the most frequent, with 18 isolates, two of them collected from food implicated in two poisoning outbreaks which occurred in different years [14].

3.3. Mapping of *se* and *tst* probes on *Sma*I genomic profiles of *S. aureus*

In order to locate the toxin genes in the *Sma*I genomic profiles of *S. aureus*, Southern hybridization with specific probes for each toxin gene was performed. Results from hybridizations of the control strains are shown in Fig. 2, and those from the human and food isolates are indicated on the *Sma*I profiles shown in Fig. 1. In Fig. 1, it can also be observed that each probe mapped on distinctive fragments. (i) The *sea* probe mapped on fragments of eight different sizes, two of them belonging to *Sma*I profiles falling into L1, and two into L3. (ii) The *tst* probe mapped on a fragment of ca. 85 kb in 11 of the 12 profiles generated by TSST-1 strains, seven falling into L1 and three into L2. Although a fragment of this size was also present in the remaining L1-profile (S8), the *tst* probe mapped on a different fragment (ca. 230 kb). (iii) The *seb* probe mapped on fragments of three sizes, ca. 324 kb in profiles falling into L4; ca. 300 kb in the non-grouped S25, and larger than 674 kb in S20 (from the SEB-prototype strain). No hybridization signals were obtained in the two L5-profiles, indicating that the *seb* gene could be located in a non-resolvable fragment. (iv) The *sec* probe mapped to the largest (>800 kb) fragment of three profiles falling into L6, and in lower fragments in S34 and S35 (ca. 285), S36 (ca. 117 kb), S15 (ca. 375 kb) and S30 (ca. 190 kb of the SEC-prototype strain). (v) The *sed* probe hybridized on fragments of ca. 320 and 33–36 kb in all profiles generated by SED, SEC/SED and SEA/SED strains, with the exception of the two SED isolates generating the S41 profile (in which it mapped on a ca. 53.5-kb fragment).

3.4. Plasmid analysis of toxigenic *S. aureus* isolates

The analysis of the plasmid content of the toxigenic isolates was carried out in several steps. Initially, plasmids were extracted from these isolates, separated and visualized in agarose gels. Plasmids were recovered from 41 out of the 77 (53%) isolates, but some plasmids appeared in two or more forms, showing at least two bands of different intensity. This suggests that in addition to the supercoiled covalently closed circular forms, other forms (relaxed circles, and linear molecules) could also be present. Some of these forms were not always present in different extractions from a single isolate, and some of the forms from different isolates and profiles

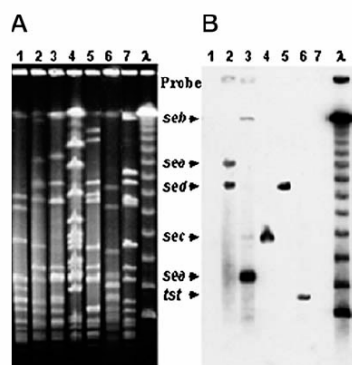


Fig. 2. *Sma*I PFGE analysis of *S. aureus* strains used as controls. Panel A, PFGE profiles. Panel B, results from the hybridization of panel A with specific probes for *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst*. Lane 1, NCTC 8325 used as both PFGE- and *se/tst*-negative control. Lane 2, CECT 976 SEA-prototype. Lane 3, CECT 4459 SEB-prototype. Lane 4, CECT 4465 SEC-prototype. Lane 5, CECT 4466 SED-prototype. Lane 6, MUO TSST-prototype. Lane 7, CECT 59 SE/TSST-negative. Lanes λ , Lambda ladder PFGE Marker (New England Biolabs).

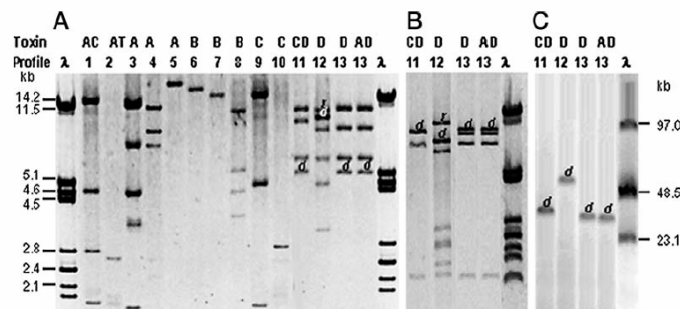


Fig. 3. Plasmid analysis of toxigenic *S. aureus*. Panel A, profiles generated with *EcoRI*. Panels B and C, profiles generated with *HindIII* and S1 PFGE, respectively, of isolates carrying *sed* plasmids (profiles *E11* to *E13* of panel A). Lanes λ , lambda digested with *psfI*. Lane L, Low Range PFGE Marker (New England Biolabs). The italic letters *d* and *r* indicate the fragments in which the *sed* and *ser* probes, respectively, mapped. In all fragments in which *sed* mapped, *sej* and *ser* probes also did so. The distribution of isolates into *EcoRI* profiles is shown in Table 1.

were a similar size. In order to optimize the plasmid analysis as a typing procedure, the total plasmid DNA from each isolate was tested by restriction analysis using *EcoRI*. In this case, the profile (PRP) generated from each isolate was always identical, and the 41 plasmid-containing isolates could be differentiated into the 13 PRPs (*E1* to *E13*) shown in Fig. 3. Relationships between PRPs with specific toxins were observed: *E1*–*E5* with SEA; *E6*–*E8* with SEB; *E9*–*E10* with SEC; *E11* with SEC-SED; *E12*–*E13* with SED. However, 23 out of the 24 strains containing the *tst* gene were free of plasmids. The distribution of strains into *EcoRI* profiles is compiled in Table 1. It is noteworthy that the number of isolates carrying plasmids, and therefore the number of *EcoRI* profiles reported in this study, may not be accurate, due to plasmid extraction failure in some of the isolates considered plasmid-free. On the other hand, a relationship between some *EcoRI* plasmid profiles, represented by two or more isolates, with PFGE genomic profiles was also observed (Table 1). The most relevant were *E9* with S31a (11 SEC isolates), *E3* with S14 (four SEA isolates), *E11* with S31b (three SED/SEC isolates), *E13* with S42 and profiles that fell into L8 (eight SED and one SED/SEA isolates), and plasmid-free with S2 and profiles that fell into L1 and L2 (10 TSST-1 and 13 TSST-1/SEA isolates).

When *EcoRI* plasmid profiles were hybridized with toxin probes, the results showed that only *sed* was plasmid-located, mapping on fragments of ca. 5.3 kb (Fig. 3, panel A, profiles *E11* and *E13*) and ca. 10.0 kb (Fig. 3, panel A, profile *E12*). Plasmids from these isolates were digested with *HindIII*, and an identical distribution of isolates in the profiles was obtained, although the *sed* probe mapped on a fragment of different size in each profile (Fig. 3, panel B).

It has been reported that the prototype SED plasmid, pIB485 [11], in addition to the *sed* gene, contained two other toxin-encoded genes: *sej* and *ser* [5,12]. In order to ascertain if this was the case for our SED isolates (nine SED, three SEC/SED and one SEA/SED) and for the controls CECT 976-SEA and 4466-SED, the following tests were carried out. (i) The amplification with *sej* and *ser* primers of DNA samples from each isolate showed that all except two of the SED iso-

lates generated amplicons of the expected size, indicating the presence of both genes. The two exceptions corresponded to strains generating the S41 genomic and the *E12/H12* plasmid profiles, from which the *ser* gene could not be amplified. (ii) Hybridization of *EcoRI* and *HindIII* plasmid profiles (as well as *SmaI* genomic profiles) with *sej* and *ser* probes confirmed the majority of the amplification data. It showed that both probes mapped to the plasmid and genomic fragments in which the *sed* probe had previously hybridized, excluding the *ser* probe that hybridized with ca. 11.2-kb and 11.1-kb fragments from the *E12* and *H12* plasmid profiles, respectively (Fig. 3, panels A and B). Both plasmid profiles were generated by PCR from the 53.5-kb plasmid of the two strains that were *ser*-negative. On the other hand, the analysis of the *ser* nucleotide sequence did not reveal *HindIII* and *EcoRI* restriction sites for these endonucleases. (iii) Plasmid analysis with nuclease S1-PFGE followed by hybridization with *sed*, *sej* and *ser* probes revealed the presence of two *sed-sej-ser* plasmids of ca. 33 and 36 kb, and one *sed-sej-ser*-like plasmid of ca. 53.5 kb, which corresponded to the restriction profiles *E13/H13*, *E11/H11*, and *E12/H12*, respectively (Fig. 3). These plasmids were labeled pUO-SED1 (ca. 33 kb, and had restriction profiles very similar or identical to pIB485); pUO-SED2 (ca. 36 kb, and had restriction profiles similar but not identical to pIB485); and pUO-SED3 (ca. 53.5 kb, and had restriction profiles very different from pIB485). The distribution of SED plasmids amongst the isolates under study is compiled in Table 1.

4. Discussion

The findings of the present investigation provide us with some answers to the questions raised in relation to both epidemiological and genetic aspects of toxigenic *S. aureus*. With respect to the first question (the proportion of isolates producing the main serological types, SEA to SED and TSST-1, or carrying their genes), 23.9% of the *S. aureus* isolates from human carriers and 26% from manually handled foods produced SEs. Conversely, the proportion of TSST-1 isolates was

lower in food than in humans (1.5% vs. 13.2%, and 2.3% vs. 15.4%, when the toxins or the genes were evaluated, respectively, showing a statistically significant difference). Percentages from humans, although considerable, were lower than those reported in previous works, for both SEs (between 36% and 46%) [22–25] and TSST-1 (between 19% and 40%) [22,24–26]. In other studies, percentages from food for SEs, as well as the frequency of each SE, were also very variable [4,13,27,28]. When specific toxins were correlated with the sample origin, SEA and TSST-1, alone or together, were more frequently found in human than in food isolates, whereas for SED and SEC the opposite was true. Dairy products and cakes containing milk derivatives were the foods mainly associated with these toxins. However, none of the isolates from dairy products contained the SEC-TSST-1 combination encoded by the SaPIbov and associated with *S. aureus* of bovine origin [7]. It is noteworthy that this combination has been found in our laboratory in milk samples from cows with subclinical mastitis (unpublished data).

Regarding the second and third questions (toxigenic isolates genetically homogeneous or heterogeneous, and existence of a correlation between toxin profiles and genetic types traced by *Sma*I-macrorestriction genomic analysis), a high genetic heterogeneity ($S \geq 0.15$) was found, which is in accordance with data from other studies [29–32]. Specific toxins and toxin profiles correlated with distinctive *Sma*I genomic profiles and lineages. This correlation is also supported when results from hybridizations of *Sma*I profiles with specific probes are included.

The fourth question (conformity of the location in chromosome or plasmids of the toxin genes in our isolates with reported data) could also have an affirmative answer, with the following two exceptions regarding SED. It is known since 1989 that SED is encoded by a plasmid named pIB485 [11] that also encodes SEJ [12] and SER [5]. In our study, three types of SED plasmids could be differentiated. Two of them, pUO-Sa-SED1 (carried by a majority of SED strains, including the SEA- and SED-prototypes) and pUO-Sa-SED2 (carried only by the three SEC-SED human isolates), have sizes and generated restriction-hybridization profiles similar to those of the pIB485-like plasmids [5,12]. A third plasmid, pUO-Sa-SED3, had a larger size (ca. 53.5 kb), generated very different restriction-hybridization profiles from the pIB485-like plasmids and contained *sed* and *sej* genes and one or more *ser*-like genes. The latter is supported by two facts: no amplification of *ser* gene, and positive hybridization of two fragments (one also containing *sed-sej* genes) in both *Eco*RI and *Hind*III plasmid profiles. Also, in the *Sma*I genomic profile (S41) of the two food isolates carrying pUO-Sa-SED3, the three probes mapped on an intense ca. 53.5-kb fragment, which corresponded to the size of the plasmid. This is a new type of plasmid carrying *se* genes, which will be the subject of further investigation. The second exception was that in the *Sma*I genomic profiles from all except the two isolates carrying pUO-Sa-SED3, the *sed*, *sej* and *ser* probes mapped on a ca. 320-kb fragment. This fact suggests the chromosomal

insertion of a plasmid or part of a plasmid of the pIB485-related group, carrying, at least, three *se* genes. Additional investigation will be necessary in order to establish the inserted plasmid sequences and the gene array. In *S. aureus*, the existence of a putative nursery of superantigens, named cluster *egc*, that carried five or six *se* genes has been reported [3,6], as well as several other SaPIs that contained more than one toxin gene [4,7]. Insertion of plasmid *se* genes into the chromosome could be advantageous for *S. aureus*, because the chromosomal location guarantees a higher stability of the genes.

The last question was “could the obtained information be useful for epidemiological and genetic purposes?” This has been partially answered in previous paragraphs. Additional data revealing facts of interest for food microbiology and public health could be the following. (i) Six of the seven lineages represented by human carrier isolates were also represented by isolates from manually handled foods. It is noteworthy that both SEA and SEC food isolates representing organisms implicated in outbreaks [14] showed identical or similar features to non-outbreak-related SEA or SEC isolates from both humans and foods recovered over a different time period. These data could be important, because today there is little evidence of the complete transmission route of staphylococcal food intoxication, like person handling foods → foods → patient line [4,22,29–32]. (ii) At least four lineages including [TSST-1 and TSST-1-SEA], [TSST-1], [SEA and SEA-SEC] and [SEC and SEC/SED] isolates can be considered endemic, because they have been colonizing the nasal mucous of healthy people living in our region over the period 1997–2002. They have also been recovered from manually handled foods at different times, including the latter in the associated outbreak cited above [14]. (iii) Accurate knowledge of the endemic and sporadic types or lineages of toxigenic *S. aureus* requires a more intensive and systematic investigation. Data from the present study will serve as a reference for future research on epidemiological surveillance of this pathogen in the PA. Similarly, the data derived from this study will enable a comparison of toxigenic types collected from different geographic areas, sources, and time periods by other authors. (iv) This last point could be of interest because *S. aureus* food poisoning is rarely recorded in Spain. The number of sporadic episodes or outbreaks microbiologically diagnosed is small, and therefore there is limited information about the prevalence of SE types or their endemic and/or epidemic feature. Relevant information about the frequency in Europe of staphylococcal food poisoning is compiled in The 7th and 8th Reports of the WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe (<http://www.bgvv.de/internet/7threport/7threintro.htm>) and (<http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threintro.htm>). It has to be said that over the period 1999–2000, more than 3700 incidents of staphylococcosis were recorded, but the real number should be greater, because not all countries have given data. To our knowledge, similar reports of the incidence of toxic shock syndrome do not exist.

Acknowledgements

We would like to thank C. González (Instituto de Productos Lácteos, Villaviciosa, Asturias), M.A. González-Hevia (Laboratorio de Salud Pública del PA, Oviedo) and CECT for food isolates and reference strains; J. Sierra (Hospital Clínico, Barcelona) for his advice in the application of PFGE and the NCTC 8325 strain, J.A. Alvarez-Riesgo for his help in statistical analysis, and M. Rosario Rodicio for the critical revision of the manuscript. We also wish to thank to OXOID, Spain for SET-RPLA and TST-RPLA kits. This work has been supported by a grant from the “Fondo de Investigación Sanitaria” PI020172.

References

- [1] N. Balaban, A. Rasooly, Staphylococcal enterotoxins, *Int. J. Food Microbiol.* 61 (2000) 1–10.
- [2] M.M. Dinges, P.M. Orwin, M. Schlievert, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clin. Microbiol. Rev.* 13 (2000) 16–34.
- [3] S. Jarraud, M.A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougel, et al., *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*, *J. Immunol.* 166 (2003) 669–677.
- [4] Y. Le Loir, F. Baron, M. Gautier, *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet. Mol. Res.* 2 (2003) 63–76.
- [5] K. Omoe, D.L. Hu, H. Takahashi-Omoe, A. Nakane, K. Shinagawa, Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids, *Infect. Immun.* 71 (2003) 6088–6094.
- [6] C. Letertre, S. Perelle, F. Dilasser, P. Fach, Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*, *J. Appl. Microbiol.* 95 (2003) 38–43.
- [7] R.P. Novick, Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*, *Plasmid* 49 (2003) 93–105.
- [8] M.S. Bergdoll, B.A. Crass, R.F. Reiser, N.R. Robbins, J.P. Davis, A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with the toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates, *Lancet* 1 (8228) (1981) 1017–1021.
- [9] W.A. Ferens, G.A. Bohach, Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells, *J. Lab. Clin. Med.* 135 (2000) 225–230.
- [10] J.E. Alouf, H. Muller-Alouf, Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects, *Int. J. Med. Microbiol.* 292 (2003) 429–440.
- [11] K.W. Bayles, J.J. Iandolo, Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 4799–4806.
- [12] S. Zhang, J.J. Iandolo, G.C. Stewart, The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*), *FEMS Microbiol. Lett.* 168 (1998) 227–233.
- [13] D.A.A. Mossel, J.E.L. Corry, C.B. Struijk, R.M. Baird, *Essentials of the Microbiology of Foods*, Wiley, New York, 1995.
- [14] M.C. Martín, J.M. Fueyo, M.A. González-Hevia, M.C. Mendoza, Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 279–286.
- [15] J.M. Fueyo, M.C. Martín, M.A. González-Hevia, M.C. Mendoza, Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins, *Int. J. Food Microbiol.* 67 (2001) 139–145.
- [16] M.C. Martín, M.A. González-Hevia, M.C. Mendoza, Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples, *Food Microbiol.* 20 (2003) 605–610.
- [17] S. Murchan, M.E. Kaufmann, A. Deplano, R. de Ryck, M. Struelens, C.E. Zinn, et al., Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 1574–1585.
- [18] F.C. Tenover, R.D. Arbeit, R. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, et al., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 2233–2239.
- [19] M.J. Struelens, A. Bauernfeind, A. Van Belkum, D. Blanc, B.D. Cookson, L. Dijkshoorn, et al., Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems, *Clin. Microbiol. Infect.* 2 (1996) 2–11.
- [20] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [21] B.M. Barton, G.P. Harding, A.J. Zuccarelli, A general method for detecting and sizing large plasmids, *Anal. Biochem.* 226 (1995) 235–240.
- [22] M. Hatakka, K.J. Björkroth, K. Asplund, N. Mäki-Petäys, H.J. Korkeala, Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from hands and nasal cavities of flight-catering employees, *J. Food Prot.* 11 (2000) 1487–1491.
- [23] B.L. Roder, N.H. Eriksen, L.P. Nielsen, T. Slotsbjerg, V.T. Rosdahl, F. Espersen, No difference in enterotoxin production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood compared with strains isolated from healthy carriers, *J. Med. Microbiol.* 42 (1995) 43–47.
- [24] H.D. Larsen, A. Huda, N.H.R. Eriksen, N.E. Jensen, Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens, *Vet. Microbiol.* 76 (2000) 153–162.
- [25] E. Uemura, S. Kakinohana, N. Higa, C. Toma, N. Nakasone, Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers, *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (2004) 21–24.
- [26] H.I. Daghistani, A.A. Issa, A.A. Shehabi, Frequency of nasal and wound isolates of *Staphylococcus aureus* associated with TSST-1 production in Jordanian population, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27 (2000) 95–98.
- [27] J.P. Rosec, J.P. Guiraud, C. Dalet, N. Richard, Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France, *Int. J. Food Microbiol.* 35 (1997) 213–221.
- [28] V. Atanassova, A. Meindl, C. Ring, Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR, *Int. J. Food Microbiol.* 68 (2001) 105–113.
- [29] H.-Y. Tsen, G.k. Yu, I.-T. Lin, Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods, *J. Food Prot.* 58 (1997) 147–153.
- [30] Y. Suzuki, M. Saito, N. Ishikawa, Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks, *Int. J. Food Microbiol.* 46 (1999) 271–274.
- [31] H. Wei, L. Yang, Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 2186–2190.
- [32] H.L. Wei, C.S. Chiou, Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler, *Epidemiol. Infect.* 128 (2002) 15–20.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal of Food Microbiology 94 (2004) 279–286

INTERNATIONAL JOURNAL OF
Food Microbiologywww.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks

M.C. Martín^{a,b}, J.M. Fueyo^a, M.A. González-Hevia^c, M.C. Mendoza^{a,*}^aDepartamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, C/ Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain^bInstituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain^cLaboratorio de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Principado de Asturias, Carretera del Rubín s/n, 33001 Oviedo, Spain

Received 27 July 2003; received in revised form 27 October 2003; accepted 12 January 2004

Abstract

Three food poisoning restaurant outbreaks due to *Staphylococcus aureus*, occurring during June–October 2002 in the Principality of Asturias (PA), Spain, provided the basis for investigating some aspects of the molecular epidemiology of this organism. The methods applied to identify strains and lineages included multiplex-polymerase chain reaction (PCR) to detect nine enterotoxin (*se*) genes, and three DNA fingerprinting procedures: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Sma*I, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) with two selected primers, and plasmid restriction analysis with *Hind*III. Thirty-two isolates were differentiated into three non-*se* and 12 *se* strains, which were outbreak-specific, except for one that was represented in two of the outbreaks. In outbreak 1, the 16 food isolates analyzed had *sec*, *seg* and *sei* genes and generated a distinctive DNA fingerprint, being assigned to a single strain. This strain could be categorized as endemic in the PA and associated to manually handled dairy products and nasal carriers. In outbreak 2, the four food isolates analyzed fell into three strains, each one displaying a different *se*-gene profile (*sea*, *sec* and *seg-seh-sei*) and a distinctive DNA fingerprint. In outbreak 3, the five food isolates tested fell into four *seg-sei* strains generating identical RAPD but different PFGE and plasmid profiles, and one *sea* strain also collected from two nasal carriers. This last strain had also been found in manually handled vegetables in outbreak 2, and it belongs to a not very frequently found *sea* lineage in the PA. Multiplex-PCR to detect *se* genes together with the three applied DNA fingerprint typing procedures proved therefore to be useful tools in subclassifying *S. aureus* for epidemiological purposes.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxins; Food poisoning; Outbreaks; PCR; DNA fingerprinting

1. Introduction

Staphylococcus aureus food poisoning is due to the ingestion of preformed toxins (SEs) produced in foods. SEs are single-chain proteins and, at least,

those designated SEA to SEE and SEG to SEU and encoded by *sea* to *see* and *seg* to *seu* genes, respectively, have been identified (Balaban and Rasooly, 2000; Dinges et al., 2000; Alouf and Muller-Alouf, 2003; Letertre et al., 2003; Mempel et al., 2003). It has been reported that virtually all SEs are superantigens and are encoded by mobile (and therefore variable) genetic elements including phages, plasmids

* Corresponding author. Fax: +34-985103148.

E-mail address: cmendoza@uniovi.es (M.C. Mendoza).

and pathogenicity islands (Alouf and Muller-Alouf, 2003; Mempel et al., 2003; Orwin et al., 2003). The four SEs, originally described, can be detected with commercial antisera, and because DNA sequence information is available for *se* genes, PCR now offers an attractive alternative for the detection of SEs (Su and Wong, 1997; McLauchlin et al., 2000; Martín et al., 2003).

S. aureus food poisoning can course either as sporadic episodes or outbreaks, although in Spain only outbreaks are usually notified to the Microbiology and Epidemiology Centers. The 7th Report of the WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe (<http://www.bgvv.de/internet/7threport/7threp.fr.htm>) recorded that in Spain, during the period 1993–1998 there occurred 228 staphylococcal outbreaks (4.1% of the reported outbreaks), ranking in second place after *Salmonella* (1163 outbreaks, 21.1%). In the Principality of Asturias (PA), a Northern Spanish Region with about 1,100,000 inhabitants and covering an area of about 10,565 km², *S. aureus* food poisoning is rarely recorded and therefore limited information exists about the prevalence of SE types, or their endemic and/or epidemic character. This is due to the fact that the number of sporadic episodes or outbreaks microbiologically diagnosed is small. Accordingly, the incidence of food poisoning incidents in which *S. aureus* could have been involved may be much higher than recorded. During the second half of 2002, three food poisoning outbreaks occurred with the affected people showing symptoms including vomiting, nausea, abdominal pain, and diarrhea. Each outbreak took place in a different restaurant and at a different time. Vomit samples from the affected people were not microbiologically analyzed, but in the three outbreaks *S. aureus* isolates were recovered from foods suspected to be the source of poisoning as well as from the nasal cavities of some restaurant employees. The existence of a set of outbreak-associated *S. aureus* isolates provided the opportunity to assess the usefulness of different genetic procedures for the detection of enterotoxins and DNA typing, which could reveal some aspects of the molecular epidemiology of this organisms in the PA.

This study was accordingly conducted (i) to assign SE isolates from manually handled foods and food handlers (human carriers) to genetic types, through the

analysis of their SE/*se* profile and DNA fingerprint (polymorphism in the whole genome by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), and plasmid content); (ii) to ascertain the type and number of SE strains implicated in each outbreak and between outbreaks; and (iii) to compare the genetic outbreak-associated SE-types with other, apparently non-epidemic SE-types, collected from foods and human carriers in the PA over 1996–2002, in order to approach their role as sporadic or endemic types.

2. Materials and methods

2.1. Sources and strains of *S. aureus*

The *S. aureus* isolates analyzed in this study together with their original sources are compiled in Table 1. In SE/*se*-detection five prototype strains of *S. aureus* were used as positive controls: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) 976-SEA, 4459-SEB, 4465-SEC, 4466-SEDJ, and ATCC 27664-SEE. *S. aureus* CECT 59 and NCTC 8325, initially described as non-enterotoxigenic, were used as negative controls. In PFGE *S. aureus* NCTC 8325, generating a distinctive DNA profile was used as control of fragment size (Murchan et al., 2003). The 32 outbreak-related *S. aureus* isolates had been recovered and identified in different Microbiology Laboratories of the PA, and were sent to the Microbiology Laboratory of the University of Oviedo for molecular analysis. In a first step, in order to verify features in relation with virulence, the *S. aureus* isolates were assayed by the coagulase test (Staphylase), production of thermonuclease on DNase medium, hemolytic activity on Columbia Blood Agar, and production of SEs by the SET-RPLA (Staphylococcal enterotoxin A, B, C, D detection kit by reversed passive latex agglutination), from Oxoid Diagnostic Reagents, Basingstoke, UK.

2.2. Isolation of genomic DNA and detection of enterotoxin genes by PCR

For the isolation of the total genomic DNA and the detection of *sea* to *see* and *sej* genes by multiplex-polymerase chain reaction (PCR) the procedures de-

Table 1
Features of the outbreak associated *S. aureus* isolates analyzed in this work

Outbreak ^a Sample (No)	SE/ <i>se</i>	PFGE profile	RAPD profile	Plasmids		Strain
				PP	PRA	
<i>Outbreak 1</i>						
Employee-1 (2)	NT/ <i>seg</i>	<i>Sma-1</i>	S7 C1	–	–	1
Employee-2	–	<i>Sma-2</i>	S1 C1	1	<i>H1</i>	2
Cooked-lamb (5)	SEC/ <i>sec-seg-sei</i>	<i>Sma-3</i>	S4 C3	2	<i>H2</i>	3
Shellfish-salad (5)	SEC/ <i>sec-seg-sei</i>	<i>Sma-3</i>	S4 C3	2	<i>H2</i>	3
Paella (4)	SEC/ <i>sec-seg-sei</i>	<i>Sma-3</i>	S4 C3	2	<i>H2</i>	3
Cream-cake (2)	SEC/ <i>sec-seg-sei</i>	<i>Sma-3</i>	S4 C3	2	<i>H2</i>	3
<i>Outbreak 2</i>						
Employee-3	–	<i>Sma-4</i>	S8 C6	3	<i>H3</i>	4
Employee-4	SEA/ <i>sea-seg</i>	<i>Sma-5</i>	S7 C1	–	–	5
Employee-5	NT/ <i>seg-seh</i>	<i>Sma-6</i>	S5 C4	–	–	6
Cream-cake (2)	NT/ <i>seg-seh-sei</i>	<i>Sma-7</i>	S9 C5	4	<i>H4</i>	7
Vegetables ^b (2)	SEA/ <i>sea</i>	<i>Sma-8</i>	S1 C1	5	<i>H5</i>	8
Beef	SEA/ <i>sec-seg</i>	<i>Sma-9</i>	S1 C1	–	–	9
	SEC/ <i>sec-seg</i>	<i>Sma-9</i>	S1 C1	–	–	9
<i>Outbreak 3</i>						
Employee-6	SEA/ <i>sea</i>	<i>Sma-8</i>	S1 C1	5	<i>H5</i>	8
Employee-7	–	<i>Sma-10</i>	S1 C1	6	<i>H6</i>	10
Employee-8	SEB/ <i>seb-seg-sei</i>	<i>Sma-11</i>	S10 C1	7	<i>H7</i>	11
Employee-9	SEA/ <i>sea</i>	<i>Sma-8</i>	S1 C1	5	<i>H5</i>	8
Stuffed crab	SEA/ <i>sea</i>	<i>Sma-8</i>	S1 C1	5	<i>H5</i>	9
Shellfish salad (2)	NT/ <i>seg-sei</i>	<i>Sma-12</i>	S1 C1	8	<i>H8</i>	12
		<i>Sma-12</i>	S1 C1	9	<i>H9</i>	13
Cream-cake (2)	NT/ <i>seg-sei</i>	<i>Sma-13</i>	S1 C1	9	<i>H9</i>	14
		<i>Sma-13</i>	S1 C1	8	<i>H8</i>	15

^a Outbreak 1 occurred on June 11th 2002, registering 54 episodes corresponding to people that had eaten in restaurant 1. Outbreak 2 took place on October 5th 2002, registering 27 episodes corresponding to diners in restaurant 2. Outbreak 3 occurred on October 26th 2002, registering 70 episodes corresponding to diners in restaurant 3. (No), number of isolates when higher than one analyzed from samples of the indicated food-type, showing the reported features.

^b Vegetables were served together with beef.

scribed in Martín et al. (2003) were used. The multiplex-PCR procedure was extended for detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes by an additional multiplex-step using the primers described in McLaughlin et al. (2000).

2.3. Genetic typing methods

Three DNA fingerprint typing methods were used: PFGE, RAPD and restriction plasmid profile. PFGE was performed with *Sma*I by means of the CHEF-DRIII SYS220/240 (Bio-Rad laboratories, Madrid, Spain) using basically the protocol described in Murchan et al. (2003) with the following modifications: run time 22 h with a pulsing switch time of 5–40 s in a 1% gel with 0.5 Tris–borate–EDTA circulating at 14 °C. Gels were analyzed by visual interpretation and PFGE profiles differing in one or more fragments were considered different. For RAPD, extraction of total DNA and amplification reactions using the primers labeled S (5'-TCAC-GATGCA-3') and C (5'-AGGGAACGAG-3') were performed under the conditions described in Soto et al. (1999) and Fueyo et al. (2001). For plasmid analysis, plasmid DNA was recovered using the alkaline lysis with lysostaphin method and the plasmid profiles were visualized in agarose gels (Sambrook et al., 1989). Plasmid DNA from each isolate was then tested by restriction plasmid analysis (RPA) by digestion with *Hind*III (Amerham Biosciences Europe, Barcelona, Spain). Restriction patterns generating identical banding were assigned to a single RPA profile. PFGE and RPA profiles were labeled with Arabic numbers following the detection order in this work, whereas RAPD profiles were labeled following a previous description (Fueyo et al., 2001).

3. Results and discussion

3.1. Features of the *S. aureus* outbreak-associated strains

Results from biochemical and immunological test in relation with virulence features showed that all the 32 *S. aureus* outbreak-associated isolates were positive for coagulase, lecithinase (weak in human isolates from outbreak 1) and thermonuclease, but showed weak or absent hemolytic activity. Five, one, and eighteen isolates were positive for SEA, SEB, and SEC, respectively (Table 1).

When the outbreak-associated isolates and control strains of *S. aureus* were tested for *se*-detection by PCR, the following results were found. First, among

the outbreak-associated isolates, amplicons corresponding to six genes grouped into eight gene combinations (*sea*, *sea-seg*, *sec-seg*, *seg-seh*, *seg-sei*, *seb-seg-sei*, *sec-seg-sei*, *seg-seh-sei*) were detected. Second, in addition to their characteristic *se* genes the control strains CECT 976-SEA, 4459-SEB, ATCC 23235-SEDJ contained other unexpected SE-encoded genes (*sed* and *sej*), (*seg*, *sei*, and *seh*) and (*seg*, *sei*, and *sej*), respectively, and CECT 59, originally identified as non-SE, generated one amplicon compatible with the *seg* gene (figure not shown).

PFGE differentiated the outbreak-associated isolates into 13 profiles (Fig. 1) and each PFGE profile could be related with a *se* profile (Table 1). RAPD performed with primers S and C differentiated the outbreak-associated isolates into seven and five profiles, respectively (Fig. 2) and two profiles (S1 and C1) were generated by isolates with a different *se* profile. Twenty six out of the thirty-two outbreak-associated isolates carried plasmids grouped into different PPs (Fig. 3A) but some observations are noteworthy: (i) all the PPs showed at least two bands of different intensity, suggesting that in addition to

the covalently closed circular forms, other forms (open circles, and linear molecules) could also be present; (ii) some of these forms were not always present in different extractions from a single isolate; (iii) some of the plasmid forms, from different isolates and profiles, showed a similar size. In order to optimize the plasmid analysis as a typing procedure the total plasmid-DNA from each isolate was tested by restriction analysis using *Hind*III. In this case, the RPA profile generated from each isolate was always identical, and the 26 isolates carrying plasmids were differentiated into the nine RPAs shown in Fig. 3B.

Each of the three DNA fingerprinting typing procedures (PFGE, RAPD, and RPA) was useful to discriminate the outbreak isolates into profiles (Figs. 1–3). Isolates with identical *se* gene, PFGE, RAPD, and RPA profiles were considered as belonging to a single strain. In this way a total of 15 outbreak-associated strains were identified, and the strains associated to each outbreak were distinctive excepting one (strain 8) that was associated to outbreaks 2 and 3 (Table 1). In the following sections we will comment

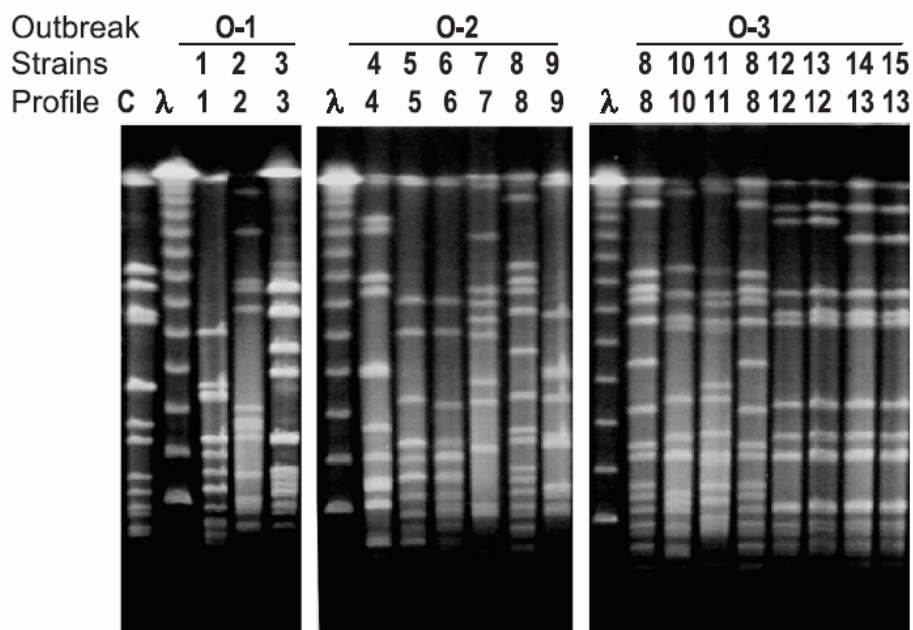


Fig. 1. PFGE profiles generated with *Sma*I of outbreak-associated *S. aureus* isolates. O-1 to O-3, outbreaks 1 to 3. Lane C, PFGE profile from NCTC 8325 as the reference standard. Molecular sizes in kb of the fragments from top to bottom are: 674, 361, 324, 262, 257, 208, 175, 135, 117, 80 and 60. Lane λ, lambda ladder PFG marker. The distribution of isolates into PFGE profiles is shown in Table 1.

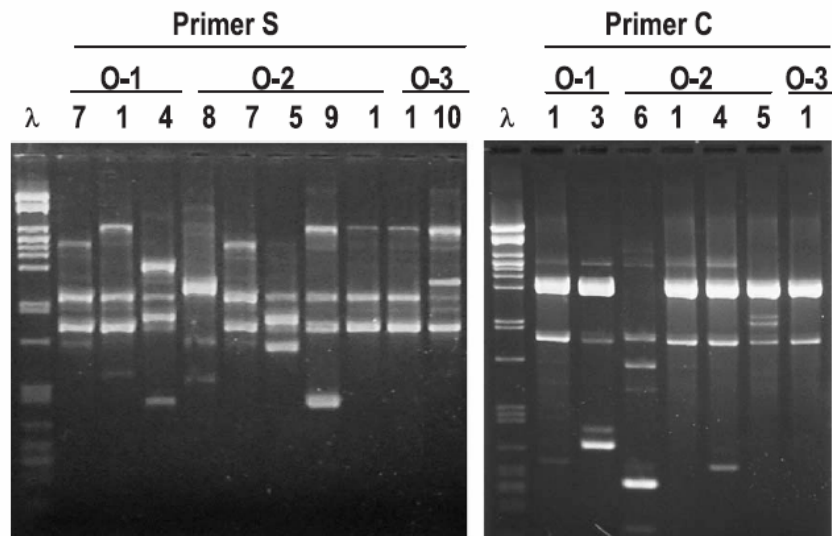


Fig. 2. RAPD profiles using primers S and C of outbreak-associated *S. aureus* isolates. O-1 to O-3, outbreaks 1 to 3. Lane λ , DNA of phage lambda digested with *Pst*I. Lanes 1 to 10, RAPD profiles. The distribution of isolates into RAPD profiles is shown in Table 1.

on relevant results in relation with the strains involved in each outbreak.

3.1.1. Outbreak 1

Nineteen isolates, 3 from human carriers and 16 from foods, were analyzed (Table 1). Two of the human isolates from a single patient (one from nasal

cavities and other from the pharynx) showed identical features (generated amplicons with *seg*-primers, PFGE-*Sma*-1 and RAPD-*S7C1* profiles, and were plasmid-free), being grouped into strain 1. The third human isolate was negative for SE/*se* and generated other distinctive DNA fingerprinting profiles, being labeled strain 2. The 16 food isolates, collected from

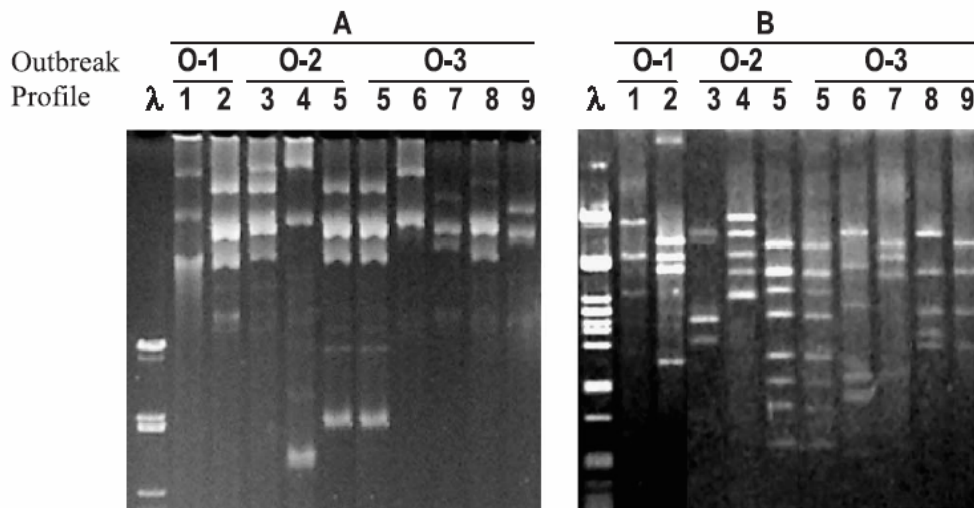


Fig. 3. Plasmid analysis of outbreak-associated *S. aureus* isolates. Panel A, plasmid profiles (PP). Panel B, *Hind*III restriction plasmid analysis (RPA) of the PPs included in panel A. O-1 to O-3, outbreaks 1 to 3, respectively. Lane λ , DNA of phage lambda digested with *Pst*I. The distribution of isolates into PPs and RPA profiles is shown in Table 1.

different food samples, generated SEC/*sec-seg-sei*, PFGE *Sma-3*, RAPD *S4C3*, and RPA-*H2* profiles, data showing that they belong to a different strain (strain 3). These data support the conclusion that a cross contamination among different manually handled foods had occurred, and that different foods had been implicated in the collective food poisoning. Another epidemiological observation in relation with the strain 3 is that its DNA fingerprinting (PFGE-*Sma-3*, RAPD-*S4C3* and RPA-*H2*) is frequently generated by SEC/*sec* isolates (which could also carry other *se* genes) collected in PA from cheeses and manually handled foods. In fact, a strain with similar features was related with another food poisoning incident associated to a cream cake in 1999 (unpublished data). On the other hand, strains with similar features have also been collected from nasal carriers, but in a lower rate than from manually handled milk containing foods (Fueyo et al., unpublished data).

Two other studies, about PFGE typing of *S. aureus* causing food poisoning carried out in Taiwan (Chiou et al., 2000) and Japan (Suzuki et al., 1999), showed that SEC/*sec* isolates generated PFGE profiles identical or similar to our *Sma-3*. The data suggest that these Taiwanese, Japanese and Spanish isolates belong to the same genetic type, grouping or lineage, which could be considered as distributed worldwide.

3.1.2. Outbreak 2

Seven isolates, three from human carriers and four from foods, were analyzed (Table 1; Figs. 1–3). Among the human isolates one was SEs/*se* negative, while the other two were SEA/*sea-seg* and *seg-seh*, respectively. Each of the three generated a distinctive DNA fingerprint being assigned to strains 4, 5, and 6, respectively. The four food isolates contained *se* genes but in three *se* profiles: *seg-seh-sei* and *sea* with one isolate each and SEC/*sec-seg* with two isolates. Isolates of different *se* profile showed different DNA fingerprinting, being assigned to strains 7, 8, and 9, respectively. These data show contamination of the foods by at least three types of enterotoxigenic *S. aureus*, represented by three different *se* strains which could not be found among the restaurant employees tested. This was the first time that the *Sma-8* to -10 PFGE profiles were identified in our laboratory. However, 14 out of the 17 fragments defining the *Sma-8* profile could be considered common to a profile found among non-outbreak-

associated human SEA isolates in the PA (unpublished data). In conclusion, attending to the number and types of SE strains found in foods a possible double origin, or primary source, of the *se* strains causing poisoning could not be disregarded.

3.1.3. Outbreak 3

Nine isolates, four from human carriers and five from foods, were analyzed (Table 1; Figs. 1–3). Among the human isolates only one was SEs/*se* negative, another one was SEB/*seb-seg-sei* (each with a distinctive DNA fingerprint) and the other two were SEA/*sea* (and generated PFGE-*Sma-8*, RAPD-*S1C1*, and RPA-*H5* profiles) being assigned to strains 10, 11, and 8, respectively. The five food isolates were *se*-positive, one of these showed features corresponding to the above reported strain 8, while the remaining four generated *seg-sei* and RAPD-*S1C1* profiles, but could be discriminated by PFGE and RPA profiles into four strains (labeled strains 12–15). These data suggest that at least five *se* strains, producing three different SE-toxins, were involved in the food poisoning. One of the employees was identified as the primary infection source of strain 8 (which was also recovered from manually handled vegetables in outbreak 2). None of these *se* strains can be considered as frequent or endemic in our region since their PFGE profiles have not been found in our laboratory among about 100 previously analyzed SE/*se* isolates (unpublished data). However, as noted above, epidemic strain 8 shows a strong genetic relationship with other human SEA strains collected in the PA, which can be clustered in an endemic lineage (PA-SEA).

It is also noteworthy that most of the fragments included in the PFGE profiles of the endemic PA-SEA lineage were also included in the PFGE-1 profile generated by SEA *S. aureus* isolates implicated in a food poisoning outbreak in Taiwan. This Taiwan SEA strain was also collected from a food handler who was considered the source of this infection (Wei and Chiou, 2002).

3.2. Usefulness of four genetic methods as tools in molecular epidemiology studies of enterotoxigenic *S. aureus*

Results from the present work show how the four genetic methods applied are useful tools in the inves-

tigation of outbreaks of *S. aureus* food poisoning, leading to the identification of the *se* strains involved. In addition, the comparison of features of these *se* strains with previously analyzed non-outbreak associated *se* strains in our laboratories gave an insight into the endemic character of some of the former (or the lineage enclosing them) in the PA.

Features in relation to the advantages of each of the methods were the following. (i) Multiplex-PCR. The variant used enabled us to detect six *se* genes grouped into seven *se* profiles among the 32 *S. aureus* isolates associated to food poisoning, whereas the SET-RPLA only allowed the detection of three toxins in three profiles. On the other hand, some of the control strains presented *se*-gene profiles different to those initially reported, which included additional *se* genes. These data support the observation that in prospective or future studies of food poisoning due to *S. aureus* it is important to test the highest number possible of SEs or their *se* genes, and that multiplex-PCR is an accurate procedure for this purpose. (ii) PFGE analysis. It has been considered as the “gold standard” for typing *S. aureus* and other pathogens, and studies in our laboratory support this fact. It is noteworthy that PFGE performed with *Sma*I generates well-defined banding profiles or restriction genomic patterns, which can be used with different epidemiological and genetic purposes, such as to compare and cluster isolates of different origin, to map probes for representative genes, to estimate the size of the genome of each strain, and to analyze genetic relatedness among strains. The present study allowed us to compare PFGE profiles of the isolates associated to the three independent outbreaks in order to group them according to genetic relationships. It was also a useful tool to compare PFGE profiles from the set of the outbreak-associated strains collected in 2002 in the PA with those from other sets of strains, including: non-outbreak-associated and collected in the PA between 1994–2002, as well as from outbreak-associated strains collected in other countries. In this way, the relationships between PFGE profiles from some epidemic strains could be revealed. (iii) RAPD typing. The two-way RAPD procedure used in this work also showed a good sensibility, reproducibility and discriminatory power, but this was lower than PFGE typing (8 and 13 profiles, respectively, among outbreak-associated isolates). On the other hand, RAPD

is faster and less expensive than PFGE. These features suggest that RAPD (in combination with the *se*-gene profile) could be an alternative typing method to PFGE for some epidemiological studies such as that reported here. (iv) Plasmid typing. Restriction analysis performed with *Hind*III of the whole plasmid DNA from individual strains also proved to be a good secondary marker in the present investigation. Some results on which to comment are the following. Six out of the fifteen strains were plasmid-free but two of these lacked *se* genes and each of the remaining four generated a different *se*-gene profile. The outbreak-associated isolates were grouped into nine RPA profiles (not including the plasmid-free profile) and each of these showed a good co-relation with both *se* profiles and PFGE profiles. Similar co-relations have also been found among non-epidemic *se* strains analyzed previously in our laboratory.

Acknowledgements

We thank Dr. I. Huerta for outbreak epidemiological data; Dr. J. Sierra for his advice in the application of PFGE and the NCTC 8325 strain; Dr F. Uruburu (CECT) for the *S. aureus* reference strains; and the personnel of the Microbiology Laboratories of the “Hospital Central de Asturias, Sección de Silicosis” (Oviedo) and “Hospital de Cabueñes” (Gijón) for their collaboration with the LSP in recording the human nasal isolates of *S. aureus* analyzed in this work. We also wish to thank OXOID, Spain for the SET-RPLA, and Dr. M. Rosario Rodicio for her advise in the manuscript revision.

This work has been supported by a grant from the “Fondo de Investigación Sanitaria” PI020172.

References

- Alouf, J.E., Muller-Alouf, H., 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 240–429.
- Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 1–10.
- Chiou, C., Wei, H., Yang, L., 2000. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2186–2190.

- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16–34.
- Fueyo, J.M., Martín, M.C., González-Hevia, M.A., Mendoza, M.C., 2001. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 139–145.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P., 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 38–43.
- Martín, M.C., González-Hevia, M.A., Mendoza, M.C., 2003. Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiol.* 20, 605–610.
- McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G., 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 63, 479–488.
- Mempel, M., Lina, G., Hojka, M., Schnopp, C., Seidl, H.P., Schaffer, T., Ring, J., Vandenesch, F., Abeck, D., 2003. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* psolates from patients with atopic eczema. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 306–309.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garai-
zar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjö, U., Coombes, G., Cookson, B., 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1574–1585.
- Orwin, O.M., Fitzgerald, J.R., Leung, D.Y., Gutierrez, J.A., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., 2003. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect. Immun.* 71, 2916–2919.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Soto, S.M., Guerra, B., González-Hevia, M.A., Mendoza, M.C., 1999. Potential of a three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method within twelve *Salmonella* serotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4830–4836.
- Su, Y.C., Wong, A.C.L., 1997. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.* 60, 195–202.
- Suzuki, Y., Saito, M., Ishikawa, N., 1999. Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 271–274.
- Wei, H.L., Chiou, C.S., 2002. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* 128, 15–20.



Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain

José M. Fueyo^a, M. Carmen Mendoza^a, Miguel A. Alvarez^b, M. Cruz Martín^{a,b,*}

^a Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, C/Julián Clavería no. 6, 33006-Oviedo, Spain

^b Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), 33300-Villaviciosa, Asturias

Received 24 September 2004; received in revised form 26 November 2004; accepted 5 January 2005

First published online 13 January 2005

Edited by J.-I. Flock

Abstract

Staphylococcus aureus recovered from nasal carriers, producers and non-producers (43 isolates each) of classical pyrogenic toxin superantigens (PTSAGs), were screened for 17 additional PTSAG-genes by PCR. Percentages of 88.4 and 65.1 were positive for some new enterotoxin-gene, and 76.7 and 55.8 for enterotoxin-gene-clusters (*egc*-like), respectively. The 86 isolates belonged to 17 toxin-genotypes (all *eta*-, *etb*-, *etd*-, *see*- and *sep*-negative), and generated 40 *Sma*I-genomic profiles that in a dendrogram of similarity ($S \geq 0.7$) clustered into nine lineages and 11 non-clustered branches. Correlations between classical PTSAGs and *Sma*I-lineages were established and *egc*-like groupings appeared dispersed in six lineages.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Enterotoxins; Superantigens; PCR; PFGE

1. Introduction

The primary habitats of *Staphylococcus aureus* in humans are the mucosae of the nasopharynx where the bacteria exist as a persistent or transient member of the normal microbiota without causing any symptoms. Human carriers are the major infection source of *S. aureus*, which can cause both nosocomial and community-acquired diseases, which range from simple abscesses to fatal sepsis, plus toxinoses. For this complex set of diseases, *S. aureus* produces and secretes 30 or more specific pathogenicity factors that interfere with host

defences [1]. Some *S. aureus* strains are able to produce staphylococcal enterotoxins (SEs), toxic shock syndrome toxin (TSST-1), and exfoliatins (ETs) which are involved in distinct pathologies but share common biological activities such as pyrogenicity, immunosuppression, and non-specific T-cell proliferation and are therefore referred to as pyrogenic toxin superantigens (PTSAGs). Besides the common features, some PTSAGs are able to cause other symptoms, but only the SEs have emetic activity and cause primarily acute gastrointestinal damage [1–3]. SEs were initially discovered in studies of *S. aureus* implicated in poisoning outbreaks, and they were classified into distinct serological types. In recent years, increasing data resulting from partial or complete genome sequence analysis have allowed the identification of several new SE types [4–9]. Genes encoding PTSAGs are located in different genetic elements including prophages (*sea*, *see*, *sep*, *eta*), plasmids (*seb*, *secl*,

* Corresponding author. Present address: Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, C/Julián Clavería no. 6, 33006-Oviedo, Spain. Tel.: +34 985 193560; fax: +34 985 103148.

E-mail address: mcm@ipla.csic.es (M.C. Martín).

sed, *sej*, *ser* and *etb*), and pathogenicity islands (*tst*, *seb*, *sec*, *sek-seo*, *seq*, and *etd*) [6–10]. An enterotoxin gene cluster (*egc*) encoding a putative nursery of superantigens, with five genes (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) and two pseudogenes (*ψent1* and *ψent2*) has been identified [4] and located in the sequenced genome of methicillin-resistant strains as a part of a pathogenicity island [6,8]. An *egc*-derivative encoding SEG, SEI and SEN variants and the new SEU (*seu* is the result of a 15 bp insertion into *ψent1*) was described two years later [5]. With respect to the frequency of *S. aureus* producing PTSAGs or carrying their genes, only the classical and well-recognised serological types (SEA to SED and TSST-1) have been strongly screened in isolates from different geographical areas, causing or not causing disease (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline>). Recent PCR-based studies indicate that the newly described SE-genes could be widely distributed among *S. aureus* [4,7,11–15], but due to their recent description, the incidence of each gene and the PTSAG-genotypes in *S. aureus* of different origin still has to be clarified. The interest of this clarification is also supported by a recent report showing that the *egc*-encoded PTSAGs are neutralized by human sera much less efficiently than are the classical PTSAGs, and that both the amounts and the spectrum of secreted PTSAGs differ between *S. aureus* carriage and *S. aureus* infection [16].

In the present study, 10 *S. aureus* control strains and 86 isolates recovered from nasal samples of healthy people, previously identified as producers or non-producers (half of each) of some of five classical PTSAGs (SEA to SED and TSST-1) [12,17–19], were subject to different experiments with two major aims. First, to ascertain in each set the proportion of isolates containing other PTSAG genes (here labeled as new), to determine

PTSAG-genotypes, and to assess the presence of *egc* and distinctive SaPIs. Second, to discriminate nasal isolates into genomic types, in order to establish the genetic relationship within PTSAG-positive isolates, and between these and PTSAG-negative isolates.

2. Materials and methods

2.1. *S. aureus* isolates

The 86 *S. aureus* isolates analyzed in this study have been collected from the nasal cavities of the young adults considered as healthy carriers living in the Principality of Asturias, Spain, over a six-year period (1997–2002). They were analyzed for the presence of five major serological toxin types (SEA to SED and TSST-1) by reversed passive latex agglutination using two commercial kits, TST-RPLA and SET-RPLA (Oxoid, Hampshire, England), and their genes by PCR [12,17–19]. Of these isolates, 43 (set A) had been identified as producers and the other 43 (set B) as non-producers of the cited classical PTSAGs and carriers of the corresponding genes. The 10 strains compiled in Table 1 were used as controls in the different experiments.

2.2. Isolation of genomic DNA and detection of PTSAG-genes

Genomic DNA isolation and detection of genes encoding PTSAGs, by conventional and multiplex-polymerase chain reaction (PCR) were achieved as previously reported [12,19]. In all PCR-assays each isolate was tested, at least twice, and positive and negative controls were always included. The primers for the

Table 1
Genetic features of the *S. aureus* control strains used in this work

Strain	Prototype	Pyrogenic toxin superantigens genes
CECT 976 (ATCC 13565) ^a	SEA/ <i>sea</i>	<i>sea</i> , (<i>sed</i> , <i>sej</i> , <i>ser</i>) ^b
CECT 4459 ^a	SEB/ <i>seb</i>	<i>sea</i> , (<i>seb</i> , <i>sek</i> , <i>seq</i>) ^c (<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>) ^d
CECT 4465 (ATCC 19095) ^a	SEC/ <i>sec</i>	(<i>sec</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i>) ^e , (<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>seu</i>) ^f
CECT 4466 (ATCC 23235) ^a	SED/ <i>sed</i>	(<i>sed</i> , <i>sej</i> , <i>ser</i>) ^b , (<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i>) ^d
CECT 59 (ATCC 9114) ^a	PTSAG-negative	(<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>seu</i>) ^f
ATCC 27664	SEE/ <i>see</i>	<i>see</i>
LMUO M81	<i>seh</i>	<i>seh</i>
CNM 3194/98 ^a	TSST-1/ <i>tst</i>	<i>tst</i> , (<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>seu</i>) ^f
CNM 3/99	ETB 2/ <i>etb</i>	<i>etb</i> , (<i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>seu</i>) ^f
NCTC 8325 ^{a,g}	TSAG-negative	

^a *Sma*I-profiles shown in Fig. 1. CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), ATCC (American Type Culture Collection), NCTC (National Collection of Type Cultures), CNM (Centro Nacional de Microbiología), LMUO (Laboratorio de Microbiología Universidad de Oviedo).

^b Gene-grouping associated to plasmids [7].

^c Gene-grouping associated to SaPI3 [10].

^d Gene-grouping named *egc* [4].

^e Gene-grouping associated to SaPI4 [10].

^f A variant of *egc* including the *seu* gene [5].

^g PFGE control [24].

following genes, and the size of the amplicons (in bp) generated by them, have been previously described: *see*-512 and *sej*-648 [18]; *sei*-576 and *sen*-680 [15]; *seh*-494 and *seg*-683 [20]; *sek*-278 and *seq*-285 [21]; *seu*-141 [5], *sel*-359, *sem*-473, *seo*-722, *sep*-276 and *ser*-700 [22], and *eta*-741, *etb*-629 and *etd*-376 [23]. In multiplex-PCR different sets of primers were assayed with the control strains. On the basis of amplicon profile and reproducibility, six primer-sets were selected to test the 86 nasal isolates: set-1 (*eta*, *etb*, *etd*), set-2 (*see*, *sej*), set-3 (*seg*, *seh*, *sei*), set-4 (*sem*, *sen*, *seu*), set-5 (*sel*, *seo*, *sep*), and set-6 (*seq*, *ser*). The *sek*-primers did not generate amplicons in the different combinations tested; for this reason they were tested alone. In this and previous works [12,17–19,22] using PCR-procedures to detect virulence genes, we have observed a high frequency of false negatives and a lower rate of false positives. This difficulty was minimized using isolated DNA, instead of bacterial culture, as template and testing all isolates at least twice. When results did not conform in the two assays and/or the gene-grouping of an isolate did not match with the expected genetic element in which should be inserted, the isolate was tested again by conventional PCR. Statistical comparison between producer and non-producer isolates was performed using the “two-sample tests of proportion independents” (software: Stata 6.0. Stata Corporation, TX, USA). Differences between groups were considered statistically significant if *P* values were ≤ 0.05 .

2.3. Macrorestriction-pulsed field gel electrophoresis analysis

Whole DNA from each *S. aureus* isolate was analyzed by macrorestriction-PFGE performed with *Sma*I by means of the CHEF-DRIII SYS220/240 (Bio-Rad Laboratories, S.A., Madrid, Spain) basically using the consensus protocol [24]. *Sma*I banding profiles were analyzed visually, recording the presence or absence of each band, and those showing one or more mismatching bands were considered different. *Sma*I-profiles were initially grouped according to the toxins produced by the isolates generating them and numbered. The similarity between *Sma*I-profiles was traced in two ways: number of mismatching fragments and cluster analysis. For the latter, an unweighted pair method with arithmetic averages (UPGMA) was used together with Jaccard's similarity coefficient (*S*) in the software Program MVSP 3.1 (Multivariate Statistics Package for PCs, RockWare Inc^R). Isolates generating *Sma*I-profiles that differ from six or less bands ($S \geq 0.7$) were considered genetically related. The discrimination index (DI) (i.e. the probability that two unrelated isolates obtained from the population would be placed into different *Sma*I-profiles) was calculated by using Simpson's index of diversity (MVSP 3.1, 15).

3. Results

3.1. PCR detection of new PTSAg-genes in *S. aureus* isolates positive or negative for classical PTSAGs

Control strains and the two sets of nasal isolates were tested for 17 new PTSAG genes by PCR. Results showed that six of the eight PTSAG prototype strains contained some additional PTSAG gene to the one for which they are prototype, and the CECT 59 strain initially considered PTSAG-negative was found to be positive for six SE-genes (Table 1). All the 86 nasal isolates were negative for *eta*, *etb*, *etd*, *see* and *sep*, and 20 (23.3%) of them were negative for the 17 new PTSAG-genes. In Table 2 results are compiled from comparing the frequency of the new SE-genes and PTSAG-genotypes in the two sets. In set A, 38 isolates (86.4%) were positive for new SE-genes and the remaining five isolates carried only one classical PTSAG-gene (*sea* in three isolates, or *tst* in two isolates); while in set B, 28 (65.1%) isolates were positive for new SE-genes (statistically significant difference, $P = 0.0053$).

Some PTSAG-genes always appeared associated (Tables 1 and 2), and a part of these associations could be related with specific genetic supports: (i) *seo*–*sem*–*sen*–

Table 2
Frequency of new PTSAG genes and PTSAG genotypes among *S. aureus* isolates collected from nasal samples of healthy humans

Gene (No.)	Genotype: gene groupings (No.)
Set A^a	
<i>seg</i> (33)	G1: <i>tst</i> (2)
<i>seh</i> (5)	G2: <i>tst</i> , <i>sea</i> , <i>egc2^c</i> (11)
<i>sei</i> (33)	G3: <i>tst</i> , <i>egc2^c</i> (3)
<i>sej</i> (5)	G4: <i>tst</i> , <i>seh</i> , <i>egc2^c</i> (3)
<i>sek</i> (3)	G5: <i>sea</i> (3)
<i>sel</i> (7)	G6: <i>sea</i> , <i>sec</i> , <i>seh</i> (2)
<i>sem</i> (33)	G7: <i>sea</i> , <i>egc1^d</i> (1)
<i>sen</i> (33)	G8: <i>seb</i> – <i>sek</i> – <i>seq^e</i> (3)
<i>seo</i> (33)	G9: <i>seb</i> , <i>egc1^d</i> (3)
<i>ser</i> (5)	G10: <i>sec</i> – <i>sel^f</i> , <i>egc1^d</i>
<i>seu</i> (17)	G11: <i>sec</i> – <i>sel^f</i> , <i>sed</i> – <i>sej</i> – <i>seg^g</i> , <i>egc1^d</i> (3)
	G12: <i>sed</i> – <i>sej</i> – <i>ser^g</i> , <i>egc1^d</i> (2)
Set B^b	
<i>seg</i> (23)	G13: <i>egc1^d</i> (21)
<i>seh</i> (1)	G14: <i>egc2^c</i> (3)
<i>sei</i> (23)	G15: <i>egc1^d</i> , <i>seh</i> (1)
<i>sem</i> (23)	G16: <i>seo</i> (2)
<i>sen</i> (23)	G17: <i>seq</i> (1)
<i>seo</i> (25)	G0: none (15)
<i>seq</i> (1)	
<i>ser</i> (3)	

^a Set A includes 43 isolates producers of classical PTSAGs.

^b Set B includes 43 isolates non-producers of classical PTSAGs.

^c *egc2*, includes the *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* and *seu* genes [5].

^d *egc1*, includes the *seg*, *sei*, *sem*, *sen* and *seo* genes [4].

^e Gene-grouping associated to SaPI3 [10].

^f Gene-grouping associated to SaPI4 [10].

^g Gene-grouping associated to plasmids [7].

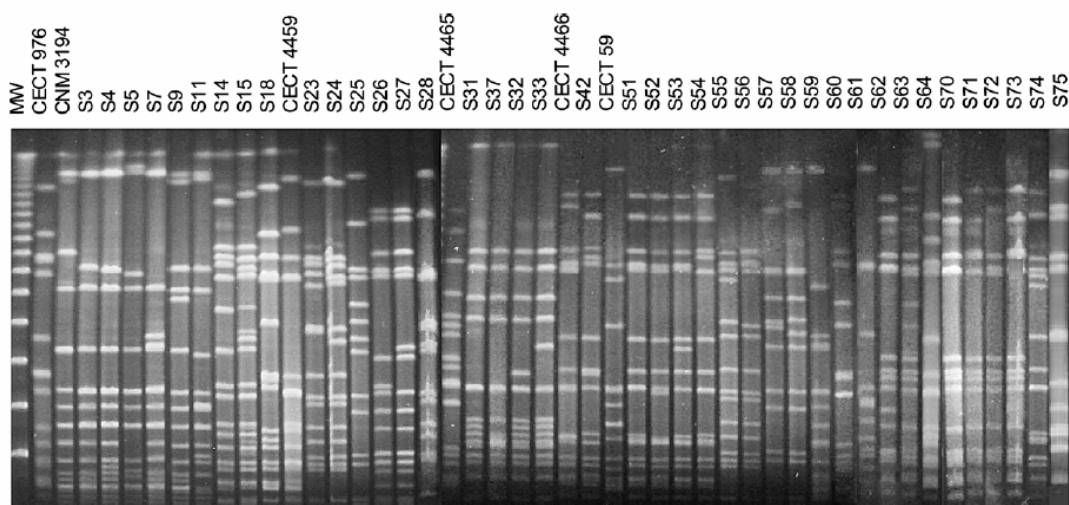


Fig. 1. *SmaI*-PFGE analysis of *S. aureus* isolates from nasal samples of healthy carriers and control strains. Lanes λ , lambda ladder PFGE Marker (New England Biolabs). Lane R, NCTC 8325 used as PFGE control; it lacks the 208-kb fragment present in the profile shown in [24]. Lanes 3–75, profiles generated by *S. aureus* isolates collected from human carriers. This is a composite figure, from three gels analysed under identical PFGE conditions. The distribution of isolates into profiles is shown in Table 2.

seg-sei with *egc* [4] or its variant also carrying *seu* [5]. Here, both were considered *egc*-like and labelled *egc1* and *egc2*, respectively. The first, *egc1*, was also present in SEB and SED prototype strains; and the second, *egc2*, in SEC, TSST-1 and ETB2 prototype strains as well as in CECT 59 (Table 1). (ii) *seb-sek-seq*, compatible with the presence of SaPI3 [8,10], was found in only three SEB nasal isolates and in the SEB-prototype; whereas *seb* (but not *sek-seq*) appeared in three other

SEB nasal isolates. (iii) *sec-sel-sem* (this last gene also forms part of *egc*), compatible with the presence of some SaPI4-like element [8,10] appeared in 10 nasal isolates and in the SEC prototype strain. The two remaining *sec*-positive isolates were *sel-sem*-negative, but were *sea*- and *seh*-positive. (iv) SEA- and SED-prototype and the eight *sed*-positive nasal isolates (and only these) were *sej*- and *ser*-positive. The *sed-sej-ser* grouping has been described as plasmid-located [7,18]. (v) These

Table 3

Relationships between PTSAg genotypes with *SmaI* genomic lineages and non-clustered profiles of *S. aureus* collected from nasal samples of healthy carriers

PTSAg-genotypes vs. <i>SmaI</i> -lineages/profiles ^a		<i>SmaI</i> -lineages/profiles ^a vs. PTSAG-genotypes	
Genotype (No.)	Lineage/profile ^a (No.)	Lineage/profile ^a (No.)	Genotype (No.)
G1 (2)	L1 (2)	L1 (19)	G1 (2), G2 (11), G3 (3) G4 (3)
G2 (11)	L1 (11)	L2 (4)	G5 (2), G6 (2)
G3 (3)	L1(3)	L3 (2)	G5, G7
G4 (3)	L1(3)	L4 (6)	G9 (2), G13 (4)
G5 (3)	L2 (2), L3	L5(2)	G8 (2)
G6 (2)	L2 (2)	L6 (15)	G10 (7), G11 (3), G13 (5)
G8 (3)	L5 (2), S28	L7 (12)	G12 (2), G13 (10)
G9 (2)	L4 (2)	L8 (2)	G13, G14
G10 (10)	L6 (7)	S59 (2)	G14 (2)
G11 (3)	L6 (3)	L9 (12)	G0 (12)
G12 (2)	L7 (2)	Others ^b	
G13 (21)	L4 (4), L6 (5), L7 (10), L8, S60		
G14 (3)	S57, S59 (2)		
G15	S61		
G16 (2)	S62, S63		
G0	L9 (12), S73 (3), S74, S75		

^a Non-clustered profiles.

^b With only one isolate. In brackets number of isolates ≥ 2 .

gene-groupings appeared alone or combined with one another and/or with other genes forming the 17 PTSAg-genotypes recorded in Table 2.

3.2. PFGE-macrorestriction analysis of genomic DNA

Control strains and nasal isolates were also analyzed by PFGE-macrorestriction performed with *Sma*I. In order to define profiles only *Sma*I fragments between ≈ 25 and 800-kb were considered. Nasal isolates were differentiated into 40 *Sma*I-profiles, and the 10 control

strains generated 10 additional *Sma*I-profiles (in Fig. 1 only six of these are shown). The number of nasal isolates representing each *Sma*I-profile is compiled in Table 3. This procedure yielded $DI = 0.96$ for the 86 nasal isolates, and $DI = 0.97$ when the control strains were included ($n = 96$).

On the basis of the coefficient of similarity of the *Sma*I-profiles shown in Fig. 1, a dendrogram was constructed; and at a cut-off point of $S = 0.7$ nine clusters (considered as lineages, L1 to L9), and 11 non-clustered branches were revealed (Fig. 2). Lineages were categorized as major when they included between three and seven profiles, and minor if only two profiles were grouped. Relevant relationships between major *Sma*I-lineages and PTSAg-genotypes are the following. L1 was found to include organisms with four PTSAg genotypes (G1–G4) with the common feature of being *tst*-positive and, except G1, also being *egc2*-positive. L4, L6 and L7 group together isolates with the common feature of being *egc1*-positive, and a part of these isolates were also positive for some other lineage-associated PTSAg-gene or gene-grouping: L4 with *seb*; L6 with *sec-sej-sem* alone or together with *sed-sej-ser*; and L7 with *sed-sej-ser*. In the remaining major lineage, L9, only PTSAg-negative isolates (G0) were found.



Fig. 2. Dendrogram of similarity illustrating genetic relatedness of the *Sma*I macrorestriction fragment profiles generated by *S. aureus*. Cluster analysis was performed by the Jaccard similarity coefficient and the unweighted pair group method. At a cut-off point of $S = 0.7$ nine clusters considered as lineages (labelled L1–L9) and 14 branches were found. The PTSAg-genotypes of control strains and nasal isolates (G0 and G1–G17) are shown in Tables 1 and 2, respectively. The number of nasal isolates falling into each PTSAg-genotype, *Sma*I-lineage, and *Sma*I-branch are compiled in Tables 2 and 3.

4. Discussion

Findings generated from the present investigation provide us with some answers to the questions raised in relation with both epidemiological and genetic aspects of *S. aureus* carrying PTSAg-genes and colonizing the nasal mucosae of healthy people. With respect to the first aim (to ascertain the proportion of isolates containing new PTSAg-genes in two sets of isolates: containing and not containing classical PTSAg-genes), a high frequency of new PTSAg-genes was found, being higher (88.4%) in the first set than in the second set (65.1%), and in both sets the genes related with *egc*-like groupings were highly prevalent. The work reporting *egc* existence already indicated the high prevalence of *seg-sei* (and thus *egc*) in strains causing toxemia or suppurative infections as well as from nasal carriers [4]. Conversely, in the present study it was also found that none of the nasal isolates contained genes encoding exfoliatin toxins, nor SEE or SEP, and nearly one-quarter lacked all the 17 new PTSAg genes screened. In other previous works, some of the new SE-genes have also been screened and were found in higher frequencies than classical SE-genes in *S. aureus* from human carriers [7, 11–14]. Our experience supports these reported data, and also indicates that the real proportion of *S. aureus* containing PTSAg-genes could be two or three times higher than that reported when only the classical-PTSAGs are screened. It is noteworthy that in a major

paper of this field [14] it was examined the relationship between human disease and 33 putative virulence determinants (13 of them genes encoding PTSAGs), concluding that eight determinants (*fnbA*, *cna*, *sdrE*, *sea*, *sej*, *eta*, *hlg*, and *ica*) were significantly commoner in invasive than in carried isolates. Only three of these eight determinants (*eta*, *sea* and *sej*) are being screened in our laboratory [12,18,19] in isolates from healthy people. Comparing results on gene frequency and gene-groupings from the 174 isolates analyzed in [14] and the 150 isolates analyzed in our laboratory, the following facts could be noticeable: (i) in the Peacock et al. study, 11 (6%) isolates were *eta*-positive (25% of the invasive isolates), while all isolates tested by us were negative. (ii) Regarding the two enterotoxin genes: *sea* appeared in a similar frequency and mainly in association with *tst* in both studies; while *sej* appeared more frequently in carriage and invasive isolates (7% and 25% respectively, and frequently not associated with *sed*) in [14] than in our laboratory (3.6% in carriage and always *sed-ser* associated, [18]).

In *S. aureus* colonizing nasal mucosae the maintaining of several PTSAG-genes suggests benefits for the bacteria and for the host, but these benefits are not fully understood. In the first case, it has been hypothesized that the apparent redundancy of the superantigens encoded by *egc* confers a selective advantage towards colonization and/or invasion of humans [4,5,14,15]. In the second case, superantigens may play an important role in modulating the host immune response, being able to establish long-term anti-tumour activity and to enhance antibody production [2,3]. On the other hand are the negative effects of PTSAGs for the host, due to their toxic and superantigenic potential. These functions reside in two separate domains that probably have different targets. Theoretically, isolates in possession of multiple PTSAG-genes should have a strong potential for causing toxinoses, together with a marked capacity for stimulating polyclonal T-cell proliferation and hence for inducing several deleterious effects in their host [1–4].

With respect to the genetic elements carrying PTSAG genes, in addition to the above observations the following are worthy of note. The sequencing of the partial or complete genome of *S. aureus* strains [6,8,10] has shown that some SaPIs contain distinctive PTSAG-genes or gene-groupings: (i) *egc1* forms part of SaPI_{n3}/SaPI_{m3} included in the ν Sa β family that harbours transposase genes, indicating that transposons may have been the origin of these islands [6,8], (ii) *tst* forms part of other islands (SaPI₁₁, SaPI₂, SaPI_{bov}) included in the ν Sa_{1–4} family, which harbours integrase genes as putative elements of genetic mobility [6,8,10]. In some of these islands, *tst* is the single PTSAG-gene but in other islands *tst* is linked to *sek-seq* or *sec-sel*. In our study, none of the 19 *tst*-isolates (nor the TSST-1 control strain, CNM 3194/98) additionally contained some of the latter four

genes, suggesting that *tst* could form part of SaPI₂ [10] or some other non-identified genetic element. (iii) *seb-sek-seq* forms part of SaPI₃ [8,10] and in the present work it was found in three nasal isolates and in the SEB-prototype strain (CECT 4459). Three other nasal isolates carried *seb* but not *sek-seq*, suggesting that the *seb* genetic element is other than SaPI₃. (iv) *sec-sel-sem* forms part of SaPI₄ [8,10] and was present in this work in 10 nasal isolates and in the SEC-prototype strain (CECT 4465, ATCC 19095). The two other SEC-isolates contain *sec* in addition to *sea* and *seh* but not *sel-sem*, suggesting that the *sec* genetic element is other than SaPI₄. These data indicated the detection of genes encoding PTSAGs by PCR as a useful tool for ascertaining the presence of both known and “new or not-described” genetic elements encoding PTSAGs. However, in order to confirm the existence of the “new” genetic elements suggested by the present work, additional investigation will be required.

Regarding the second aim (to ascertain the genetic relationship of nasal isolates carrying identical and different PTSAG-genotypes or PTSAG-lacking) a high heterogeneity of *Sma*I macrorestriction profiles was found. Some of these profiles could be clustered at different levels of similarity. Organisms generating *Sma*I-profiles with similarity $\geq 70\%$ were considered genetically related and members of the same lineage. Isolates carrying “new” SE-genes generated 31 out of the 40 *Sma*I-profiles and fell into eight of the nine *Sma*I-lineages. A relationship between *Sma*I-lineages and specific PTSAG-genes and PTSAG-genotypes was also revealed: L1 with genotypes containing *tst* (alone or together with *egc2*, or *egc2-sea*); L2 and L3 with genotypes containing *sea* (alone or together with other *se*-genes); L5 with genotypes containing *seb-sek-seq*; L4, L6, L7 and L8 with genotypes containing *egc1* alone or together with other genes (*seb* in L4; *sec-sel-sem* alone or together with *sed-sej-ser* in L6); and *sed-sej-ser* with L7. It is noteworthy that the plasmid location of *sed-sej-ser* has previously been confirmed by plasmid-hybridization assays in the five SED-nasal isolates and in the SEA- and SED-prototype strains, the plasmid size being between 33 and 36-kb [18]. Also of note is the broad dispersion of *egc*-like groupings among *Sma*I-profiles showing a high genetic heterogeneity and related with different PTSAG-genotypes. The discovery of SEU [5] in four out of 24 isolates selected as *seg-sei*-positive led these authors to suggest that further study of the prevalence of the *seu* gene in isolates of different origin would be useful [5]. Following this suggestion, some new information regarding two aspects of *seg2* is shown: first, its relatively high frequency in the total (23.2%) and within the *seg-sei*-positive (34.5%) isolates; and second, its presence in isolates also containing *tst* or *tst-sea* that form part of a distinctive *Sma*I-lineage (L1). On the other hand, using multilocus sequence typing, Peacock

et al. [14] grouped *S. aureus* into seven major clonal complexes that were related with nine virulence determinants (including *sea*, *sej* and *tst*). These authors found that most part of *sea* and *tst* isolates were clustered into a same clonal complex, whereas the *sej* isolates were distributed into this and other four clonal complexes. Our results from *SmaI* macrorestriction are concordant. In fact 11 out of the 17 *sea*-positive and all the 22 *tst*-positive isolates (11 of them positive for both genes) generated *SmaI* profiles with >70% of similarity, being considered as members of a same lineage which did not include *tst*-negative isolates. However, *sea* and *tst* were inserted in different *SmaI*-fragments, as revealed by hybridization [18], and were mediated by different genetic elements: prophages and SaPIs, respectively [6,8,10]. The wide dispersion of *sej* between clonal complexes [14,15] and *SmaI*-lineages [17, this work], could be in relation with its plasmid location.

Finally we wish to highlight that in previous works [12, unpublished data], we identified the *S. aureus* organisms implicated in four food poisoning outbreaks occurring in Asturias. Among the identified food-isolates some were SEA/*sea* or SEC/*sec-sel-egcI* or *egcI* and generated *SmaI*-profiles falling into L3, L6, and L7, respectively; moreover, and in the first case one food handler could be considered the infection source. It is also epidemiologically interesting that both SEA and SEC isolates generating similar *SmaI*-profiles to those falling into L3 and L5 have been implicated in food-poisoning outbreaks occurring in Japan [25] and Taiwan [26,27]. These findings suggest the pandemic character of both *S. aureus* lineages. In addition, it is noteworthy that *SmaI*-profiles of nasal isolates were distinct from those generated by isolates causing subclinical mastitis in dairy cows in Asturias, a dairy region, but in both human and bovine isolates the *egc*-like genes were the most frequent PTSA-genes found [22].

Acknowledgements

We thank J. Sierra (Hospital Clínico, Barcelona) and A. Vindel (Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Majadahonda, Madrid) for the NCTC 8325 and CNM 3194/98 and 3/99 strains, respectively; and CECT for the other reference strains. We are also grateful to OXOID (Spain) for SET-RPLA and TST-RPLA kits. This work has been supported by a grant from the "Fondo de Investigación Sanitaria PI020172.

References

- [1] Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schlievert, M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16–34.
- [2] Alouf, J.E. and Muller-Alou, H. (2003) Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. Int. J. Med. Microbiol. 292, 429–440.
- [3] Torres, B.A., Kominsky, S., Perrin, G.Q., Hobeika, A.C. and Johnson, H.M. (2001) Superantigens: the good, the bad, and the ugly. Exp. Biol. Med. 226, 164–176.
- [4] Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M. and Lina, G. (2001) *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J. Immunol. 166, 669–677.
- [5] Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003) Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* lineage of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 95, 38–43.
- [6] Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 357, 1225–1240.
- [7] Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and Shinagawa, K. (2003) Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect. Immun. 71, 6088–6094.
- [8] Schmidt, H. and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 17, 14–56.
- [9] Zhang, S., Iandolo, J.J. and Stewart, G.C. (1998) The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227–233.
- [10] Novick, R.P. (2003) Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 49, 93–105.
- [11] Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G. and Von Eiff, C. (2003) Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J. Clin. Microbiol. 41, 1434–1439.
- [12] Martín, M.C., Fueyo, J.M., González-Hevia, M.A. and Mendoza, M.C. (2004) Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. Int. J. Food Microbiol. 94, 279–286.
- [13] Mempel, M., Lina, G., Hojka, M., Schnopp, C., Seidl, H.P., Schafer, T., Ring, J., Vandenesch, F. and Abeck, D. (2003) High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22, 306–309.
- [14] Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G. and Day, N.P. (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 70, 4987–4996.
- [15] Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J. and Vandenesch, F. (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. 70, 631–641.
- [16] Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V., Roschack, K., Friebe, E., Selleng, K., Lovenich, S., Greve, T., Greinacher, A., Panzig, B., Engelmann, S., Lina, G. and Broker, B.M. (2004) *egc*-encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. Infect. Immun. 72, 4061–4071.

- [17] Fueyo, J.M., Martín, M.C., González-Hevia, M.A. and Mendoza, M.C. (2001) Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 139–145.
- [18] Fueyo J.M., Mendoza, M.C., and Martín, M.C., (2005) Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microb. Infect.*, in press.
- [19] Martín, M.C., González-Hevia, M.A. and Mendoza, M.C. (2003) Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiol.* 20, 605–610.
- [20] MacLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V. and O'Neill, G. (2000) The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 63, 479–488.
- [21] Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Paustian, M.L., Orwin, P.M., Kapur, V. and Schlievert, P.M. (2002) Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J. Biol. Chem.* 277, 13138–13147.
- [22] Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muñoz, J., Alvarez, M.A., and Martín, M.C. (2005) Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles in *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows, and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J. Clin. Microbiol.*, 43(3) in press.
- [23] Takayuki, Y., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Amagai, M. and Sugai M (2002) Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect. Immun.* 70, 5835–5845.
- [24] Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C., Fusing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G. and Cookson, B. (2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1574–1585.
- [25] Suzuki, Y., Saito, M. and Ishikawa, N. (1999) Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 271–274.
- [26] Chiou, C., Wei, H. and Yang, L. (2000) Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2186–2190.
- [27] Wei, H.L. and Chiou, C.S. (2002) Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* 128, 15–20.

Cytotoxin and Pyrogenic Toxin Superantigen Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles

J. M. Fueyo,¹ M. C. Mendoza,¹ M. R. Rodicio,¹ J. Muñoz,² M. A. Alvarez,³
 and M. C. Martín^{3*}

Departamento de Biología Funcional-Microbiología, Universidad de Oviedo, Oviedo,¹ and Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias (LILA), Llanera,² and Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC), Villaviciosa,³ Asturias, Spain

Received 21 July 2004/Returned for modification 5 September 2004/Accepted 17 October 2004

A set of 84 *Staphylococcus aureus* isolates collected from the milk of cows with subclinical mastitis in Asturias (a cattle region of Spain) and six control strains were tested for sequences of genes encoding hemolysins (*hla*, *hlb*, *hld*, *hlg*, and *hlg-2*), leukotoxins (*lukPV*, *lukM*, and *lukED*), toxic shock syndrome toxin (*tst*), and enterotoxins (*sea* to *see*, *seg* to *ser*, and *seu*) by conventional and multiplex PCR. It was found that 84, 83, 11, and 39 isolates carried some type of *hl*, *luk*, *tst*, or *se* gene, respectively, which were arranged in 14 exotoxin genotypes. All of the isolates were negative for *lukPV*, *hlg*, *sea*, *sed*, *see*, *sej*, *sek*, *sep*, *seq*, and *ser*. Two gene groupings could be related with pathogenicity islands—[*lukED*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* ± *seu*] with Saβ-1 and [*tst*, *sec*, *sel*] with SaPIbov, present in 45 and 13.1% of the isolates, respectively—while 11.9% of them carried both islands. Only one contained *seb* (together with vSaβ-1), and another contained *seh* (together with *lukED*). The isolates were also analyzed by pulsed-field gel electrophoresis performed with *Sma*I. Thirty-nine *Sma*I profiles (similarity coefficient [*S*] = 0.94 to 0.21) were differentiated; 12, 1, and 10 of these, respectively, were generated by isolates presumptively carrying Saβ-1, SaPIbov, or both. Five *Sma*I profiles (*S* ≥ 0.8) formed a cluster, which contained 20 and 10 isolates carrying one (vSaβ-1) or both islands. These data show the high frequency of genes encoding cytotoxins and pyrogenic toxin superantigens, their relationship with pathogenicity islands, and their distribution among a diversity of genetic types of *S. aureus* related to subclinical mastitis.

Staphylococcus aureus is a bacterium that colonizes and causes disease in mammalian hosts. It produces a wide variety of exoproteins that contribute to both colonization and the disease process (1, 7). Nearly all isolates secrete cytotoxins and enzymes (α -, β -, γ -, γ -variant, and δ -hemolysins; nucleases; lipases; hyaluronidase; and collagenase) whose main functions are to convert local host tissues into nutrients required for bacterial growth and also to promote spreading of the pathogen through the host body. Some isolates secrete one or more additional toxins, comprising leukotoxins (Luk) and pyrogenic toxin superantigens (PTSAGs), such as toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), staphylococcal enterotoxins (SEs), and exfoliative toxins. PTSAGs have profound effects on the host immune system, both acute and long term. The former include food poisoning, caused by ingestion of SEs. Superantigens are thought to act as virulence factors by subverting immune responses and causing delays in the establishment of pathogen-specific immunity (1, 7, 16, 24, 27, 30, 34). γ -Hemolysin and leukotoxins (the classical Pantone-Valentine [PVL], or LukS-PV-LukF-PV, and the new LukE-LukD and LukM-LukF'/PV) are two component toxins that kill erythrocytes and/or phagocytes by forming pores in cell membranes (7, 27, 30).

Sequencing of complete or partial genomes from several *S. aureus* strains (3, 10, 14, 15, 17) has revealed the clustering of some exotoxin genes (encoding leukotoxins, TSST-1, and SEs) within chromosomal pathogenicity islands (SaPI or vSa) and that a single strain can carry more than one SaPI (3, 15, 29). One exotoxin gene cluster (*egc*) includes five SE genes [*seg*, *sei*, *seo*, *sen*, *sem*] and two pseudogenes (14) and was later identified in the genome of clinical strains as part of a genomic island, here called vSaβ-1 (3, 15, 29). More recently, an *egc* derivative encoding SEG, SEL, and SEN variants and the new SEU (which resulted from the insertion of 15 bp within one of the pseudogenes) has been identified (17).

S. aureus is recognized worldwide as a pathogen causing intramammary infections (mastitis) in cattle. Both leukotoxins and PTSAGs are supposed to play important roles in the initiation and/or exacerbation of mastitis (7, 27, 30). In addition, it has been proved that *S. aureus* is able to colonize milk and dairy products, in which some strains secrete toxins, including thermoresistant SEs. When foods contaminated with SEs are ingested, they can cause poisoning in humans, with fever, vomiting, nausea, abdominal pain, and diarrhea as the most frequent symptoms. In fact, the classical SEs (SEA to SEE), initially identified as serological types, were defined by their pyrogenic and emetic activities and only later categorized as superantigens. More recently, new SE types (SEG to SER and SEU) have been identified on the basis of sequence and structural similarities to previously described SEs, and there is also

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain. Phone: 340985893352. Fax: 34985892233. E-mail: mcm@ipla.csic.es.

experimental evidence for their superantigenic activity, but rarely for emetic activity (1, 7, 9, 14, 16, 17, 26).

To date, there is limited information about the prevalence of the recently identified toxin and exotoxin genes, including those encoding new leukotoxins and SEs, in *S. aureus* associated with infectious diseases in animals and human food poisoning. Taking this into account, the purposes of the present study were (i) to ascertain the frequency of genes encoding hemolysins (*hla*, *hnb*, *hld*, *hlg*, and *hlg-2*), leukotoxins (*lukS-PV/lukF-PV*, *lukM*, and *lukE-lukD*), TSST-1 (*tst*), and SEs (*sea* to *see*, *seg* to *ser*, and *seu*) in a set of 84 isolates of *S. aureus* collected from the milk of cows with subclinical mastitis in Asturias, a cattle region of Spain; (ii) to group the isolates according to exotoxin genotypes (EGs) and to establish possible gene clusters and their association with SaPIs; (iii) to discriminate isolates into genomic types defined by macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) performed with *Sma*I and cluster analysis, by which means we aimed to determine the most frequent genomic types with the potential for colonizing cow mammary glands and cow milk; and (iv) to correlate EGs and SaPIs with genomic types, thus tracing the dispersion of genes associated and not associated with SaPIs among genomic types.

MATERIALS AND METHODS

***S. aureus* isolates.** The *S. aureus* isolates used in this study were recovered from milk samples from 84 cows (one isolate per cow) with subclinical mastitis in Asturias from 2003 to 2004. Asturias is a northern Spanish region covering an area of ~10,565 km² and has ca. 4,700 dairy cattle herds, each including between 4 and 200 cows. For the control of mastitis, recounts of somatic cells in pooled milk samples from each herd are routinely performed four times per month using a Fossomatic 5000 autoanalyzer (FOSS A/S, Hillerød, Denmark). Mastitis is suspected when counts of $\geq 250,000$ cells/ml are obtained and a decrease in milk production and/or moderate inflammation of the udder is observed. Milk samples from each cow of a suspected herd are independently assayed by the California Mastitis Test using commercial kits (ImmuCell, Portland, Maine, or Westfalia-Surge Inc., Naperville, Ill.). The results are visually scored on the basis of gel formation. Trace and weak-positive reactions are taken as indicators of subclinical mastitis. Infection is confirmed on the basis of elevated white cell numbers in the milk sample ($>400,000$ leukocytes/ml) and/or decrease in milk quality and isolation of pathogenic bacteria. For isolation of *S. aureus*, 20 μ l of milk were spread and incubated at 37°C for 24 h on plates of Columbia blood agar (bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, France). Identification of presumptive *S. aureus* colonies was carried out by the following assays: Gram staining, coagulase production (the Staphylase test) and thermonuclease production on DNase medium (both from Oxoid Diagnostic Reagents, Basingstoke, United Kingdom), and hemolytic activity on Columbia blood agar. They were also biochemically identified by the API Staph system (bioMérieux S.A.). In addition, the 84 *S. aureus* isolates were tested for production of five classical PTSAGs by reverse passive latex agglutination using the TST-RPLA kit for TSST-1 and the SET-RPLA kit for SEA to SED (Oxoid Diagnostic Reagents). Six strains, each the prototype of a specific toxin (see Table 2), were used as controls in different experiments.

DNA isolation and PCR procedures. Genomic DNA isolation and detection of exotoxin-encoding genes (by conventional and multiplex PCR) were achieved as previously reported (20). In all PCR assays, each isolate was tested at least twice, and positive and negative controls were always included. Primers previously described for *hla*, *hnb*, *hld*, *hlg*, *hlg-2*, *lukS-PV/lukF-PV* (*lukPV*), *lukM*, *lukE-lukD* (*lukED*), *sei*, and *sen* (generating amplicons of 209, 309, 111, 535, 390, 433, 780, 269, 576, and 680 bp, respectively) (13); *sea* to *see* and *sej* (generating amplicons of 566, 424, 315, 401, 512, and 648 bp, respectively) (20); *seh* and *seg* (with amplicons of 494 and 683 bp) (19); *sek* and *ser* (with amplicons of 278 and 285 bp) (35); and *seu* (141-bp amplicon) (17) were used. Primers for other genes were designed in our laboratory from the sequences deposited in EMBL: *tst* (*tst*-1, CATCTACAAACGATAATATAAAGG, and *tst*-2, CATTGTTATTTTCCAA TAACCACCCG; accession number AP003135), *sel* (*sel*-1, AATATATACTA GTGATCTAAAGGG, and *sel*-2, TATGGAATACTACACACCCCTTATA;

accession number AP003135), *sem* (*sem*-1, ATGCTGTAGATGTATATGGTC TAAAG, and *sem*-2, CGTCCTTATAAGATATTTCTACATC; accession number AP003363), *seo* (*seo*-1, TGATGTGTAACAATGCATATGCAAATG, and *seo*-2, TTATGTAAATAAAATAACATCAATATGATGTC; accession number AP003363), *sep* (*sep*-1, TTAGACAAACCTATTATCATAATGG, and *sep*-2, TATTATCATGTAACGTTACACCGCC; accession number NC 002745), and *ser* (*ser*-1, AACCAGATCCAAGGCCTGGAG, and *ser*-2, TCACATTGTAGT CAGGTGAACCT; accession number AB075606), which generated amplicons of 481, 359, 473, 722, 276, and 700 bp, respectively. In multiplex PCR, different sets of primers were assayed with the control strains. On the basis of amplicon profile and reproducibility, nine primer sets were selected to test the 84 mastitis isolates: set 1 (*hla*, *hnb*, and *hld*), set 2 (*hlg* and *hlg-2*), set 3 (*lukPV*, *lukM*, and *lukED*), set 4 (*sea*, *seb*, and *sec*), set 5 (*sed*, *see*, and *sej*), set 6 (*seg*, *seh*, and *sei*), set 7 (*sem*, *sen*, and *seu*), set 8 (*sel*, *seo*, and *sep*), and set 9 (*seq*, *ser*, and *tst*). The *sek* primers did not generate amplicons in the different combinations tested. For this reason, they were only tested alone.

Macrorestriction-PFGE analysis. Total DNA from each *S. aureus* isolate was analyzed by macrorestriction-PFGE performed with *Sma*I by means of the CHEF-DRIII SYS220/240 (Bio-Rad Laboratories S.A., Madrid, Spain), basically using the consensus protocol (22). *Sma*I banding profiles were visually analyzed, and the presence or absence of each band was recorded. Those showing one or more mismatched bands were considered different and numbered as S80 to S92 (isolates containing PTSAG genes) and S101 to S125 (isolates without PTSAG genes). S1 to S79 have been used in our laboratory to label *Sma*I profiles generated by *S. aureus* from other origins. Relationships between *Sma*I profiles were established on the basis of the number of mismatched bands (22, 33), and the genetic similarity was determined by the unweighted pair method with arithmetic averages and Jaccard's similarity coefficient (*S*) in the software Program MVSP version 3.1 (Multivariate Statistics Package for PCs; RockWare Inc.). The discrimination index (*DI*) (i.e., the probability that two unrelated isolates obtained from the population would be placed into different *Sma*I profiles) was calculated using Simpson's index of diversity (31).

RESULTS

Phenotypic features and exotoxin genotypes of *S. aureus* isolates associated with subclinical mastitis in cows. The *S. aureus* isolates were recovered from 84 milk samples (each from a different cow with subclinical mastitis) spread on blood agar, where they produced creamy grayish-white or yellow colonies with distinct zones of hemolytic activity. In addition, they were positive in catalase, coagulase, and DNase tests. From each sample, one isolate was selected for further study ($n = 84$). When tested by reverse latex agglutination, none of the 84 isolates was positive for SEA or SED, only one produced SEB, and 11 produced both SEC and TSST-1. Next, detection of 27 exotoxin genes by conventional and multiplex PCR revealed that all isolates were negative for *lukPV*, *hlg*, *see*, *sej*, *sek*, *sep*, *seq*, and *ser*. The remaining exotoxin genes were found with different frequencies and EGs (Table 1). A total of 14 EGs were distinguished ($DI = 0.8$). The 84 isolates were positive for *hla* and *hlg-2*, and 81 and 76 of them also contained *hld* and *hnb*, respectively. All except one isolate were positive for *lukED*, and 42 also harbored *lukM*. The latter gene was more frequently detected in isolates carrying PTSAGs than in those lacking PTSAGs (34 versus 8). The single SEB- and the 11 [TSST-1, SEC]-positive isolates, and only these, were also positive for *seb* and [*tst*, *sec*, *sel*], respectively; 38 isolates proved to contain [*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*], and 32 of these also contained *seu*. Since these genes are characteristic of *egc* clusters, they will be referred to here as either *egc-1* (*seu* negative) or *egc-2* (*seu* positive). The single *seb* isolate also carried *egc-1*, while 10 out of the 11 [*tst*, *sec*, *sel*] isolates contained *egc-2*. Finally, a single *seh* isolate was negative for all other PTSAG genes tested. As indicated above, these results were obtained by both single and multiplex PCR, and representative examples of the

TABLE 1. Exotoxin genotypes and macrorestriction genomic profiles of *S. aureus* collected from milk samples from cows with subclinical mastitis

EG (no. of isolates)	Cytotoxin(s) ^a	PTSAg superantigens ^b	SmaI macrorestriction analysis	
			Profile	Cluster no.
EG1 (10)	<i>hlb, hld, lukED, lukM</i>	<i>tst, sec, sel, [seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>	S80	3
			S81	2
			S82	5
EG2 (22)	<i>hlb, hld, lukED, lukM</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]</i>	S83, S91, S92	1 ^c
			S84	4
			S82	5
			S80	8
			S89	2
EG3 (1)	<i>hlb, hld, lukED, lukM</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo]</i>	S83	1
EG4 (1)	<i>hlb, hld, lukED, lukM</i>	<i>tst, sec, sel</i>	S86	1
EG5 (6)	<i>hlb, hld, lukED, lukM</i>		S121	2
			S103, S119, S123, S125	1 ^c
EG6 (1)	<i>hld, hld, lukED</i>	<i>seb, [seg, sei, sem, sen, seo]</i>	S85	1
EG7 (3)	<i>hlb, hld, lukED</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo]</i>	S87	1
			S90	2
EG8 (1)	<i>hld, lukED,</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo]</i>	S88	1
EG9 (1)	<i>hlb, hld, lukED</i>	<i>seh</i>	S93	1
EG10 (28)	<i>hlb, hld, lukED</i>		S101, S106, S120	2 ^c
			S103	4
			S104	7
			S92, S102, S105, S108, S111, S112, S113, S114, S115, S117, S118	1 ^c
			S122	2
EG11 (2)	<i>hld, lukED, lukM</i>		S103, S107, S124	1 ^c
EG12 (3)	<i>hlb, lukED</i>		S109, S116, S119, S120	1 ^c
EG13 (4)	<i>hld, lukED</i>		S110	1
EG14 (1)	<i>hld</i>			

^a All subclinical mastitis isolates were positive for the *hla* and *hlg-2* genes.

^b *[seg, sei, sem, sen, seo]* and *[seg, sei, sem, sen, seo, seu]* have been found associated in gene clusters *egc-1* and *egc-2*, respectively (see the text).

^c Only one or two strains (as indicated) belonged to each profile.

latter are shown in Fig. 1. The EGs of the control strains are indicated in Table 2. The six strains were *hla* and *lukED* positive, and three of them also contained *egc-2*.

PFGE-genomic macrorestriction analysis of toxigenic *S. aureus* isolates. All subclinical mastitis isolates could be assigned to distinctive profiles when tested by PFGE-macrorestriction

performed with SmaI. In order to define profiles, only those fragments ranging between ca. 40 and 700 kb were considered. In total, 39 SmaI profiles could be differentiated, with the six control strains generating six additional SmaI profiles (Fig. 2). This procedure yielded a *DI* of 0.956 for the mastitis isolates ($n = 84$) and a *DI* of 0.961 if the six reference strains were also included ($n = 90$). The distribution of isolates among SmaI profiles is compiled in Table 1.

A dendrogram was constructed on the basis of coefficients of similarity between SmaI profiles (Fig. 3), and it showed considerable variation (0.94 to 0.21). At a cutoff point of $S = 0.7$, seven clusters (C1 to C7) were revealed, with two of them (C1 and C2) grouping SmaI profiles from PTSaAg-positive isolates (in which several cytotoxin genes were also detected). C2 included five profiles (S80 to S84, with ≤ 6 mismatched fragments), represented by PTSaAg isolates belonging to three genotypes: EG1 (*[tst, sec, sel]* and *egc-2*; 10 isolates), EG2 (*egc-2*; 18 isolates), and EG3 (*egc-1*; 1 isolate). In contrast, only two profiles (S88 and S90) represented by *egc-1*-containing genotypes (EG8 and EG7, respectively) fell within C1. In addition, PTSaAg isolates were also assigned to several nonclustered SmaI profiles (at the established cutoff point; see above). Thus, profiles S85, S86, and S93 were represented by the single EG6, EG4, and EG9 isolates, respectively. Four other profiles (S87, S89, S91, and S92) were generated from isolates containing *egc-1* (EG7) or *egc-2* (EG2) and by one *egc*-negative isolate (EG10; S92) (Table 1). The remaining 25 profiles (S101 to

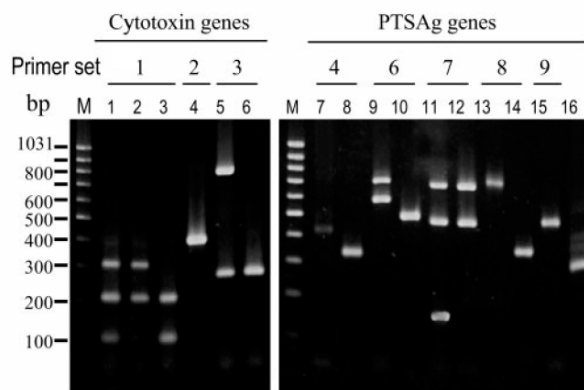


FIG. 1. Screening of exotoxin genes by multiplex PCR in representative *S. aureus* isolates associated with subclinical mastitis. Lanes M, lambda ladder PFGE markers (New England Biolabs). Lanes 1 to 15, amplicon profiles generated by mastitis isolates using the primer sets indicated at the top. Lane 16, amplicon generated using the *sek* primers. Each amplicon profile was included in different EGs (Table 1).

TABLE 2. Exotoxin genotypes of *S. aureus* control strains

Strain ^a and toxin prototype	Cytotoxin genes	PTSAg genes
CECT 976 (ATCC 13565), SEA, SED	<i>hla, hlb, hld, hlg-2, lukED</i>	<i>sea, [sed, sej, ser]^b</i>
CECT 4459; SEB	<i>hla, hld, hlg-2, lukED</i>	<i>sea, [seb, sek, seq]^c</i>
CECT 4465 (ATCC 19095); SEC	<i>hla, hlb, hld, hlg-2, lukED</i>	<i>[sec, sel, sem],^d [seg, sei, sem, sen, seo, seu]^e</i>
CECT 59 (ATCC 9114); PVL	<i>hla, hld, hlg, lukED, lukPV</i>	<i>[seg, sei, sem, sen, seo, seu]^e</i>
CNM 3194/98; TSST-1	<i>hla, hlb, hld, hlg, lukED</i>	<i>ist,^f [seg, sei, sem, sen, seo, seu]^e</i>
NCTC 8325; LukE-LukD	<i>hla, hld, hlg-2, lukED</i>	

^a CETC, Colección Española de Cultivos Tipo, ATCC, American Type Culture Collection; NCTC, National Collection of Type Cultures; CNM, Centro Nacional de Microbiología.

^b Genes carried on plasmids (16, 26) are indicated in brackets.

^c Gene cluster associated with SaPI3 (24, 29) are indicated in brackets.

^d Gene cluster associated with SaPI4 (24, 29) are indicated in brackets.

^e Variant of the *egc* cluster (here called *egc-2*) including the *seu* gene (17) are indicated in brackets.

^f Gene associated with SaPI2 (24, 29).

S125) were represented by 43 isolates that were negative for PTSAg genes, assigned to six EGs (EG5 and EG10 to -14). They showed high genetic heterogeneity ($S = 0.88$ to 0.21) (Fig. 3), although some of them could be grouped into five additional clusters (C3 to C7).

DISCUSSION

Results derived from the present research into *S. aureus* isolates recovered from milk samples from cows with subclinical mastitis will be discussed in terms of the relevance of the presence of many different virulence genes in both the pathogenesis of bovine mastitis and food safety. It is noteworthy that all except one isolate carried some type of leukotoxin gene, but only half were positive for *lukM*, the gene that encodes the most active leukotoxin for polymorphonuclear leukocytes of ruminants found in mastitis isolates (27). In addition, about half of the isolates (including both *lukM*-positive and -negative

isolates) carried a number of PTSAg genes, ranging from one to nine. These results are compatible with the hypothesis that the maintenance of PTSAs is useful for the bacterium, as they may inhibit the efficiency of the immune response of the cow (8). However, our failure to detect PTSAg genes in the other half of the isolates argues against an essential role in subclinical mastitis. Alternatively, *S. aureus* might still produce previously unidentified PTSAs that escaped detection by the techniques employed. Although the tested isolates were recovered from cows diagnosed with subclinical mastitis, the possibility that they could simply be members of the common microbiota of the cow should also be considered. In spite of this, the possession of multiple virulence genes (and the fact that virulence is multifactorial) supports a strong potential of the isolates to cause not only subclinical mastitis in their hosts but also severe illness, including clinical mastitis. Moreover, the presence of toxigenic *S. aureus* in milk could also represent a

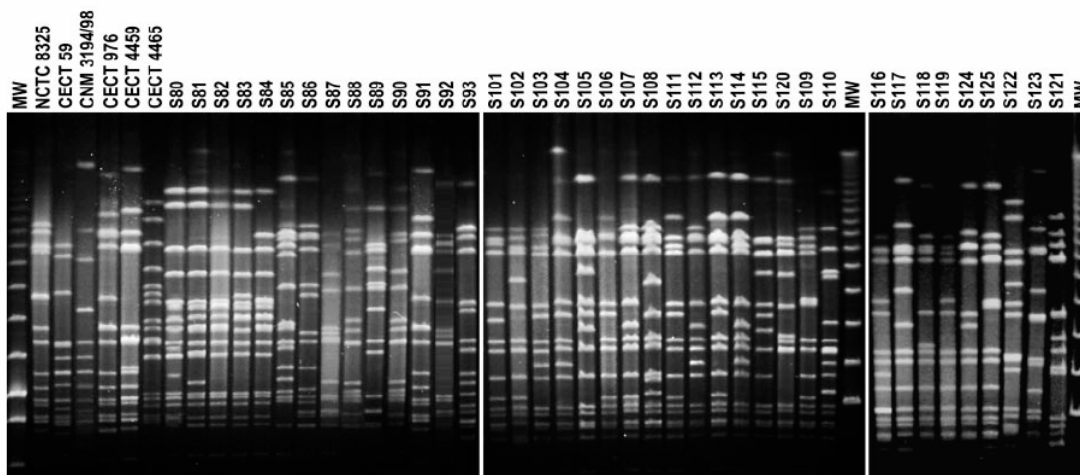


FIG. 2. Macrorestriction genomic profiles generated by *Sma*I in *S. aureus* control strains and isolates associated with subclinical mastitis. Lanes MW, lambda ladder PFGE markers (New England Biolabs). Lane NCTC 8325, quality control strain in PFGE assays. Fragment sizes from top to bottom in (kilobases) are 674, 361, 324, 262, 257, 175, 135, 117, 80, 60 and <60 (the 208-kb fragment present in the PFGE profile shown in reference 20 is lacking). NCTC 8325 was also used as a LukE-LukD prototype and an SE-TSST negative control. The next five lanes show the *Sma*I profiles generated by the prototype strains of PVL (CECT 59), TSST-1 (CNM 3194/98), SEA and SED (CECT 976), SEB (CECT 4459), and SEC (CECT 4465), respectively. Lanes S80 to S92 and S101 to S125 correspond to profiles generated by isolates positive and negative, respectively, for PTSAg genes (except S92, which includes both types). The relationships between EGs and *Sma*I profiles are compiled in Table 1.

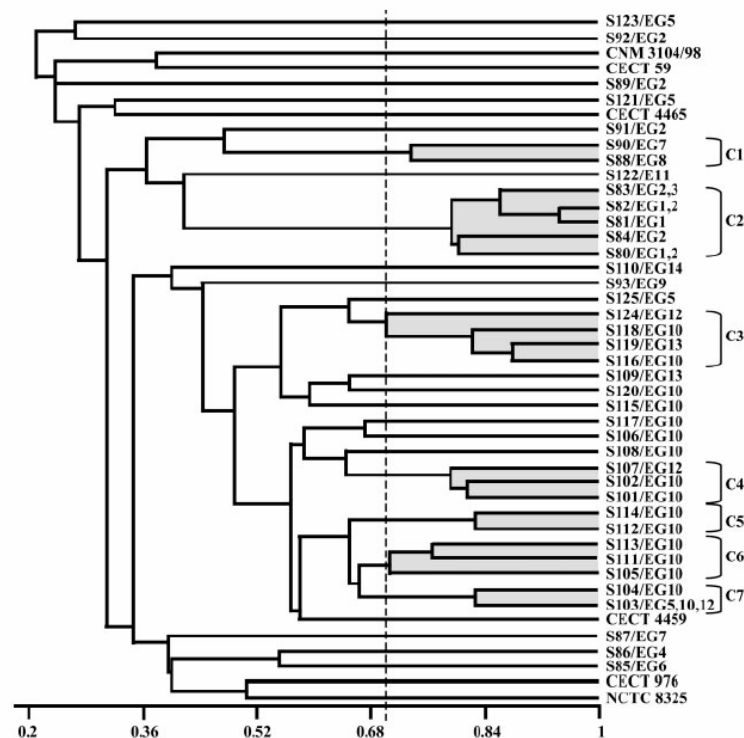


FIG. 3. Dendrogram showing genetic relatedness among *Sma*I macrorestriction fragment profiles generated from *S. aureus*. Cluster analysis was performed by the Jaccard similarity coefficient and the unweighted pair group method. Branches CECT 59, CECT 976, CECT 4459, CECT 4465, CNM 3194, and NTCC 8325 correspond to exotoxin prototype strains (Table 2). Branches S80 to S92 and S101 to S125, respectively, correspond to isolates associated with subclinical mastitis that were positive and negative for PTSAg genes (except S92, which includes both). At a cutoff point of $S = 0.7$, seven clusters (labeled C1 to C7) and 24 branches (6 corresponding to the prototype strains) were found. EG, exotoxin genotypes of isolates associated with subclinical mastitis. The numbers of isolates falling into each cluster and branch are compiled in Table 1.

serious problem for food security, if milk containing SEs (frequently with a normal appearance) reaches the human food chain, either directly or through dairy products. In fact, poisoning outbreaks caused by SE-contaminated milk are not rare. An outstanding example was an outbreak due to low-fat milk that occurred in Japan in 2000, with 13,420 cases recorded (2).

Our data on the frequency of hemolysin and leukotoxin genes are in agreement with those reported by Rainard et al. (27) showing that all isolates analyzed from a collection of *S. aureus* recovered from ruminants with mastitis harbored at least the genes for γ -hemolysin and LukE-LukD. However, they differ from those of another study (30) with isolates causing clinical and subclinical mastitis in which only 55 and 41%, respectively, produced leukotoxins. With regard to PTSAg genes, *seb* and *seh* were each found in one isolate, while the remaining genes had a wider distribution and appeared in three different clusters: [*tst*, *sec*, *sel*], *egc-1*, and *egc-2*, found in 13.1, 7.1, and 38.1% of the isolates, respectively. The presence of nine PTSAg genes encoding two classical (TSST-1 and SEC) and seven new (SEL, SEG, SEI, SEM, SEN, SEO, and SEU) superantigens in 11.9% of the isolates is noteworthy. However, a correlation of the number of PTSAg genes with the severity of mastitis has not been recorded. The classical PTSAGs found

in *S. aureus* isolates from Asturias (SEB and TSST-1-SEC) coincided with those reported for mastitis isolates collected in Ireland, the United States, and Japan (9, 23). However, they differed from data available for Italian and Korean mastitis isolates, where SED or SEA, respectively, were the most frequent toxins (5, 18), and for isolates recovered in Brazil, 65% of which produced one or several toxins but only 3.2% of which produced TSST-1-SEC (4). In the present study, classical and new *se* genes were found in 12 versus 40 isolates, respectively (ca. 1:3 proportion), and similar or even greater differences have been reported in previous screenings of isolates from a different origin in which some of the new *se* genes were included (14, 21, 25, 26, 28). This is notable, since it has been recently reported that there are large gaps in the capacity of human serum samples to neutralize *S. aureus* PTSAGs and that the *egc*-encoded superantigens are neutralized by human sera much less efficiently than classical PTSAGs (12). It is also notable that, in the present work, only 6 out of 38 isolates found to contain *egc* clusters (15.8%) were *seu* negative, while the remaining 32 (84.2%) were *seu* positive. Thus, in our series, the incidence of *egc* including the *seu* gene (i.e., *egc-2*) was much higher than that previously reported: 16.6% (17). Discrepancies between results from different countries as to the frequency of leukotoxin genes, PTSAG genes, and *egc* are not

unexpected, since (i) these genes are associated with mobile (and therefore variable) genetic elements, including SaPIs, plasmids, and phages; (ii) different strains could have gained, and maintained over time, a variable number of such elements; (iii) in agreement with the previous points, dairy cows from different geographic areas could have been colonized by strains with different virulence genotypes; and (iv) all or some of these strains, under certain conditions, may be able to invade the skin and mucous membranes of the host, causing severe illness.

When the gene clusters found in this study were compared with information available in the literature, the following noteworthy observations were made. (i) Clustering of *tst*, *sec*, and *sel* genes (here reported in 13.1% of the isolates) was initially described in SaPIbov (ν Sa2), a genomic island found in *S. aureus* of bovine origin (10). However, this gene association is also present in several islands (SaPI_n1/SaPI_m1 and SaPI_n3/SaPI_m3, belonging to the ν Sa2 and ν Sa4 families) that were identified in the genomes of human isolates (3, 15, 24, 29). (ii) Sequencing of the complete genome of *S. aureus* NCTC 8325 (here included as a control strain) and of human methicillin-resistant isolates revealed the presence of *lukED* in two chromosomal islands: ν Sa β -1, which also carries *egc-1*, and ν Sa β -2 (3, 29). Experimental data reported in this work support the presence of ν Sa β -1 in six milk isolates and suggest the existence of a ν Sa variant, harboring *egc-2* instead of *egc-1*, in 32 *seu*-positive isolates. Our results also suggest the presence of ν Sa β -2, or another element containing *lukED*, in all but one of the PTSAg-negative isolates.

PFGE-macrorestriction analysis has been reported as the "gold standard" method for typing bacteria. In fact, the procedure has already been used to discriminate *S. aureus* isolates from different human, animal, and food samples (6, 18, 21–23, 32, 33). In this work, an *Sma*I-PFGE procedure, previously harmonized for typing methicillin-resistant *S. aureus* isolates (22), was applied to type the 84 mastitis isolates. In this way, they were discriminated into 39 *Sma*I genomic profiles, which showed broad genetic heterogeneity ($S = 0.94$ to 0.21). The 44 isolates containing PTSAg genes generated 16 *Sma*I profiles, only one of which (S92) also contained a non-PTSAg isolate. It is noticeable that five *Sma*I profiles formed a cluster (C2; $S \geq 0.80$) that included 38.1% of the isolates presumably carrying the ν Sa β -1 variant, and some of them also carried SaPIbov. Accordingly, a wide variety of genomic types of toxigenic *S. aureus* could be part of the normal microbiota of cows and also be involved in bovine subclinical mastitis in Asturias. Mastitis (clinical and subclinical) generates important losses in dairy industries in the region and, as previously indicated, can be regarded as a risk factor for food poisoning in humans.

Typing results, together with the possible clustering of PTSAg and leukotoxin genes within ν Sa β -1 islands (which harbor transposase genes, indicating that transposons may have been the origin of these islands) (3, 15, 29), support the following hypotheses. (i) Horizontal transmission of the island(s) among strains of different origin; in fact, subclinical mastitis isolates generating highly different macrorestriction genomic profiles ($S = 0.2$ to 0.9) contained seven or eight genes associated with Sa β -1 islands. A similar situation was found in *S. aureus* isolates from healthy human carriers analyzed in our laboratory (unpublished results). Notably, *egc-1* or *egc-2* was identified in a high proportion of the human isolates, which

included producers and nonproducers of classical PTSAGs. However, none of the isolates displayed a PTSAg gene profile consistent with SaPIbov (references 11 and 21 and unpublished data). A wide distribution of *egc* (or its associated *seg-sei* genes) has also been reported for human and food-borne *S. aureus* isolates in other works (12, 14, 21, 25, 28). (ii) Clustering of leukotoxin and superantigen genes may be beneficial for *S. aureus* when colonizing and/or invading human and animal tissues and organs, apart from their involvement in disease (14). The same is expected for the insertion of different SaPIs into the genome of a single strain. The fact that 45 and 11.9% of our subclinical mastitis isolates, respectively, contained genes associated with Sa β -1 (without excluding the concomitant presence of Sa β -2) and with ν Sa β -1 together with SaPIbov is then relevant. (iii) Theoretically, the accumulation of *se* genes in a single strain could be related to the amount of SEs secreted in foods and therefore to the severity of food poisoning. It should be remembered that SEs act not only as superantigens but also as potent gastrointestinal toxins and that these functions are located in two separate domains (1, 7, 16). Finally, the high frequency of *egc* clusters, or their associated *seg-sei* genes, highlights the requirement in prospective or future studies of food poisoning caused by *S. aureus* to screen the highest possible number of SEs, or their *se* genes, including *egc* genes. For this, multiplex PCR could be an accurate and relatively simple procedure.

In this context, it should be borne in mind that the screening of a large number of gene sequences and isolates by conventional PCR is more time-consuming and expensive than multiplex PCR. In the present work, the screening of 27 exotoxin genes at least twice in 84 subclinical mastitis isolates plus six control strains required >5,000 conventional PCRs. The same analysis was performed with less than half the number of multiplex reactions. Therefore, the latter option represents an important saving in time and resources. However, future screenings would require an improvement of the multiplex PCR protocols reported here in order to reduce the number of reactions and to limit false-negative results (here detected by comparison with the results of conventional PCR). For this purpose, the design and evaluation of new primers and primer combinations would allow the simultaneous and reliable screening of a higher number of genes. In fact, multiplex PCR using more than four primer pairs has been successfully achieved in previous work related to the subject (19–21), although the number of screened genes was always lower than that of the present study. Finally, it is also important to ascertain the reasons for failure of *sek* amplification when attempted in conjunction with that of other genes.

In conclusion, the following findings in relation to the aims of this study can be highlighted. (i) Nearly all *S. aureus* isolates related to subclinical bovine mastitis carried genes encoding hemolysins and leukotoxins, but only half of them carried genes encoding PTSAGs. In total, the exotoxin genes could be grouped into 14 profiles, or EGs. (ii) Most of the PTSAg genes were located on two pathogenicity islands (SaPIbov and ν Sa β -1), which appeared either alone or coexisting in the same isolate. (iii) SaPIbov was mainly associated with organisms falling into one *Sma*I cluster, whereas ν Sa β -1 appeared to be dispersed in this cluster, as well as in other clustered and nonclustered isolates, showing it to be a highly ubiquitous

element. (iv) A wide variety of genomic types of toxigenic *S. aureus* could be regarded as both possible causal agents of clinical disease and risk factors for food poisoning.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Sierra (Hospital Clínico, Barcelona, Spain) and A. Vindel (Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Madrid, Spain) for NCTC 8325 and CNM 3194/98, respectively, and CECT for the other reference strains. We are also grateful to Oxoid (Spain) for SET-RPLA and TST-RPLA kits.

This work was supported by a grant from the "Fondo de Investigación Sanitaria" (PI020172).

REFERENCES

- Alouf, J. E., and H. Muller-Alouf. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. Med. Microbiol.* 292:429–440.
- Asao, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa, and S. Kozaki. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130:33–40.
- Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359:1819–1827.
- Cardoso, H. F., N. Silva, M. J. Sena, and L. S. Carmo. 1999. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Let. Appl. Microbiol.* 29:347–349.
- Cenci-Goga, B. T., M. Karama, P. V. Rossitto, R. A. Morgante, and J. S. Cullor. 2003. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows. *J. Food Prot.* 66:1693–1696.
- Chiou, C., H. Wei, and L. Yang. 2000. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2186–2190.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin, and M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16–34.
- Ferens, W. A., W. C. Davis, M. J. Hamilton, Y. H. Park, C. F. Deobald, L. Fox, and G. Bohach. 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* 66:573–580.
- Fitzgerald, J. R., P. J. Hartigan, W. J. Meaney, and C. J. Smyth. 2000. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J. Appl. Microbiol.* 88:1028–1037.
- Fitzgerald, J. R., S. R. Monday, T. J. Foster, G. A. Bohach, P. J. Hartigan, W. J. Meaney, and C. J. Smyth. 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* 183:63–70.
- Fueyo, J. M., M. C. Martín, M. A. González-Hevia, and M. C. Mendoza. 2001. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 67:139–145.
- Holtfreter, S., K. Bauer, D. Thomas, C. Feig, V. Lorenz, K. Roschack, E. Friebe, K. Selleng, S. Lovenich, T. Greve, A. Greinacher, B. Panzig, S. Engelmann, G. Lina, and B. M. Broker. 2004. *egc*-encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect. Immun.* 72:4061–4071.
- Jarraud, S., C. Mougél, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne, and F. Vandenesch. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70:631–641.
- Jarraud, S., M. A. Peyrat, A. Lim, A. Tristan, M. Bes, C. Mougél, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville, and G. Lina. 2003. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 166:669–677.
- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, H. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357:1225–1240.
- Le Loir, Y., F. Baro, and M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen. Mol. Res.* 2:63–76.
- Leterter, C., S. Perelle, F. Dilasser, and P. Fach. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95:38–43.
- Lim, S. K., Y. S. Joo, J. S. Moon, A. R. Lee, H. M. Nam, S. H. Wee, and H. B. Koh. 2004. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 66:581–584.
- MacLauchlin, J., G. L. Narayanan, V. Mithani, and G. O'Neill. 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 63:479–488.
- Martín, M. C., M. A. González-Hevia, and M. C. Mendoza. 2003. Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiol.* 20:605–610.
- Martín, M. C., J. M. Fueyo, M. A. González-Hevia, and M. C. Mendoza. 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 94:279–286.
- Murchan, S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, R. de Ryck, M. Struelens, C. E. Zinn, V. Fussing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N. El Solh, C. Cuny, W. Witte, P. T. Tassios, N. Legakis, W. van Leeuwen, A. van Belkum, A. Vindel, I. Lagoncha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsson-Liljequist, U. Ransjö, G. Coombes, and B. Cookson. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41:1574–1585.
- Nagase, N., A. Shimizu, J. Kawano, K. Yamashita, H. Yoshimura, M. Ishimaru, and A. Kojima. 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates isolated from bovine mastitis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66:1169–1172.
- Novick, R. P. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49:93–105.
- Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda, and K. Shinagawa. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40:857–862.
- Omoe, K., D. L. Hu, H. Takahashi-Omoe, A. Nakane, and K. Shinagawa. 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* 71:6088–6094.
- Rainard, P., J. C. Corrales, M. B. Barrio, T. Cochard, and B. Poutrel. 2003. Leukotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:272–277.
- Rosec, J. P., and J. P. Guiraud. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 77:61–70.
- Schmidt, H., and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:14–56.
- Schuberth, H. J., C. Krueger, H. Zerbe, E. Bleckmann, and W. Leibold. 2001. Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* 20:187–199.
- Struelens, M. J., A. Bauernfeind, A. Van Belkum, D. Blanc, B. D. Cookson, L. Dijkshoorn, N. El Solh, J. Etienne, J. Garaizar, P. Gerner-Smith, N. Legakis, H. de Lencastre, M. H. Nicolas, T. L. Pitt, U. Römmling, V. Rosdahl, and W. Witte. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2:2–11.
- Suzuki, Y., M. Saito, and N. Ishikawa. 1999. Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 46:271–274.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
- Torres, B. A., S. Kominsky, G. Q. Ferrin, A. C. Hobeika, and H. M. Johnson. 2001. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp. Biol. Med.* 226:164–176.
- Yarwood, J. M., J. K. McCormick, M. L. Paustian, P. M. Orwin, V. Kapur, and P. M. Schlievert. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J. Biol. Chem.* 277:13138–13147.

Human and bovine constitute reservoirs of different sub-populations of *Staphylococcus aureus* in possession of the highly prevalent enterotoxin gene cluster *egc*_{like}

J. M. Fueyo¹, M. R. Rodicio¹, M. C. Mendoza¹ and M. C. Martín²

¹ Department of Functional Biology, University of Oviedo, C/ Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, SPAIN

² Institute of Lactic Products of Asturias (IPLA), Asturias, SPAIN

A high proportion of *Staphylococcus aureus* contains enterotoxin gene clusters, *egc*_{like}, carrying five or six genes (*seg-sei-sem-sen-seo* ± *seu*) and forming part of a pathogenicity island, Type I- ν Sa β , which also contains the *lukE-lukD* leukotoxin genes. The present study was aimed at identifying the genomic relationships between *S. aureus* of human (58 isolates from nasal exudates of healthy carriers) and bovine (38 isolates from milk samples of cows with subclinical mastitis) origin in possession of *egc*_{like}. The relationships were traced using two procedures: genomic macrorestriction analysis performed with *Sma*I-PFGE, and determination of the toxin-genotype screening a total of 25 genes by PCR-amplification. Results showed a larger diversity of types in human than in bovine isolates; that none of the types was common to both sets; and that in all bovine but only in some human isolates *egc*_{like} could be part of Type I- ν Sa β 1. Results support that humans and bovines are reservoirs of different sub-populations of *S. aureus* carrying *egc*_{like}.

Keywords *Staphylococcus aureus*, enterotoxin gene cluster, human carriers, mastitis, superantigens, leukotoxins, PFGE, PCR, pathogenicity islands, plasmids

Una alta proporción de *Staphylococcus aureus* contiene grupos de genes de enterotoxinas denominados *egc*_{like}, integrados por cinco o seis genes (*seg-sei-sem-sen-seo* ± *seu*) que pueden formar parte de una Isla de patogenicidad, Type I- ν Sa β , que también porta los genes para una leucotoxina (*lukE-lukD*). El presente estudio se centra en identificar las relaciones genéticas entre *S. aureus* de origen humano (58 aislamientos nasales de portadores sanos) y bovino (38 aislamientos de leche de vacas con mastitis subclínica), previamente identificados como *egc*_{like} positivos. Las relaciones fueron trazadas mediante el análisis de macrorestricción con *Sma*I-PFGE; y la determinación del perfil de genes de toxinas por PCR. Los resultados mostraron mayor diversidad de tipos en aislamientos humanos que en bóvidos, y que en solo una parte de los humanos y en todos los bovinos *egc*_{like} podría asociarse a Type I- ν Sa β 1. Estos datos apoyan que humanos y bóvidos son reservorios de diferentes subpoblaciones de *S. aureus*.

1 Introduction

Staphylococcus aureus is both a commensal and an extremely versatile pathogen in humans and warm-blooded animals. The primary habitat in humans is the mucosae of the nasopharynx where it exists as a persistent or transient member of the normal microbiota without causing any symptoms. However human carriers are the major infection source of *S. aureus*. The diseases caused by this microorganism can be grouped in three basic syndromes. (i) Superficial lesions such as skin abscesses and wound infections (ii) Deep-seated and systemic infections such as osteomyelitis, endocarditis, pneumonia, and bacteraemia (iii) Toxic syndromes such as toxic shock, scalded-skin, and food poisoning. For this complex set of diseases, *S. aureus* produces and secretes numerous and specific pathogenicity factors that interfere with host defenses, including a wide variety of exoproteins that contribute to both colonization and disease process [1-3]. Only a part of the isolates secrete leukotoxins (bi-component toxins called LukE/LukD, LukS-PV⁷/LukM, LukS-PV/LukF-PV) and/or pyrogenic toxin superantigen (PTSAg) including toxic shock syndrome toxins (TSSTs), staphylococcal enterotoxins (SEs), and exfoliative toxins (ETs). *S. aureus* is also worldwide recognized as a pathogen causing intramammary infections (mastitis) in cattle where both leukotoxins and PTSAGs are supposed to play an important role in the initiation and/or exacerbation of the disease [4].

Genes encoding PTSAGs have different genetic supports including prophages, plasmids, and pathogenicity islands [1-3]. An enterotoxin gene cluster (*egc*) encoding a putative nursery of superantigens, with five genes (*seg, sei, sem, sen, seo*) and two pseudogenes (*ψ ent1* and *ψ ent2*) has been identified [5] and located in the

sequenced genome of methicillin-resistant strains as part of a pathogenicity island (ν Sa β), which also contains the genes encoding the bi-component leukotoxin LukE-LukD [3]. An *egc*-derivative encoding SEG, SEI and SEN variants and the new SEU (*seu* is the result of a 15 bp insertion into ψ *ent1*) was described two years later [6]. The aim of this study was to identify genomic relationships between *S. aureus* of human and bovine origin in possession of the highly prevalent enterotoxin gene clusters (*egc*-like) collected and partially analysed in previous studies [7, 8]. Here, we labeled *egc1* and *egc2* to the cluster carrying *seg-sei-sem-sen-seo* on its own or including *seu*, respectively.

2. Materials and Methods

2.1 *S. aureus* isolates. All the 96 *S. aureus* isolates analyzed in this study were collected in the Principality of Asturias (PA), Spain: 58 of them from nasal cavities of healthy carriers (H), and 38 from milk samples of dairy cows diagnosed with subclinical mastitis (B). All of them were analyzed for the presence of five major serological toxins (SEA to SED and TSST-1) by reversed passive latex agglutination and also for their genes by polymerase chain reaction (PCR). Other toxin genes were tested only by PCR. Control strains with distinctive toxin gene profiles reported in [7-8] were also included.

2.2 Determination of toxin gene profiles. Genomic DNA isolation and detection of exotoxin encoding genes was done by conventional- and multiplex-PCR using 25 primer pairs for the genes: *lukS-PV/lukF-PV* (*lukPV*), *lukM*, *lukE-lukD* (*lukED*), *tst*, *eta*, *etb*, *etd*, *sea-see*, *seg-ser* and *seu* [7-8]. In all PCR-assays each isolate was tested at least twice, and both positive and negative control strains were always included.

2.3 Macrorestriction-pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis. Total DNA from each *S. aureus* isolate was analyzed by macrorestriction-PFGE performed with *SmaI* by means of the CHEF-DRIII SYS220/240 (Bio-Rad laboratories, S.A., Madrid, Spain), basically using the consensus protocol as in [7-8]. The genetic similarity between *SmaI*-profiles was determined by the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) and the Jaccard's similarity coefficient (*S*).

3. Results and Discussion

The relationships between human (H) and bovine (B) isolates were traced using two genetic procedures and combining the results: toxin gene profile (TG) and macrorestriction genomic analysis performed with *SmaI*-PFGE. Results compiled in Table 1 show all different combinations of TGs, related genetic elements, *SmaI* genomic profiles, as well as the number of isolates of each set sharing the same features.

All isolates were negative for *eta*, *etb*, *see*, *sek*, *sep* and *seq*. All H-isolates were also negative for *etd*, *lukM*, and all except one also for *lukPV*. All B-isolates were negative for *sea*, *sed*, *sej*, *seh*, and *ser*, and all except one for both *seb* and *etd*. Other toxin-genes appeared at different frequencies and TGs. The H-isolates generated 15 TGs, while the B-isolates only 5 TGs. And only one appeared in both sets (TG1b: *seg-sei-sem-sen-seo*, *lukED*). On the other hand, the TGs were used as markers of the genetic elements in which the toxin genes could be inserted [2, 3, 7]. In addition to *egc*-like and *lukED* with TypeI- ν Sa β , the following associations could be traced: *tst* with SaPI2_{like} (16 H), *sea* with a prophage (11 H), *sec-sel-sem* with SaPI4_{like} (10 H), *sed-sej-ser* with plasmids (5 H); and *sec-sel-tst* with SaPIbov (10 B). It is remarkable that while all B-isolates were *lukED*-positives, a 58.6% of the H-isolates was *lukED*-negative, suggesting in this case that the *egc*_{like} support is other than ν Sa β .

Table 1. Relationships between human and bovine *S. aureus* isolates

TG	PTSAGs	Toxin gene profiles		Origin		Genomic types
		Leukotoxins	Genetic elements	H	B	<i>SmaI</i> -profiles
TG1	<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>		<i>egc1</i>	7		S31, S37, S58, S60
TG1b	<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukE</i>	ν Sa β 1	15	4	S31, S37, S51-S56, S58, S60, S87, S88, S90
TG1c	<i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED, lukM</i>	ν Sa β 1 other		1	S83
TG2	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>		<i>egc</i>	2		S59
TG2b	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	<i>lukED</i>	ν Sa β 2	1		S57
TG2c	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	<i>lukED, lukM</i>	ν Sa β 2, other		22	S80, S82-S84, S89, S91, S92
TG3	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu, tst</i>		<i>egc2, SaPI2</i>	1		S9
TG3b	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu, tst</i>	<i>lukED</i>	ν Sa β 2, SaPI2	1		S9
TG4	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu, tst, sea</i>		<i>egc2, SaPI2, prophage</i>	10		S3-S5, S7
TG4d	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu, tst</i>	<i>lukPV</i>	ν Sa β 2 SaPI2, other	1		S9
TG5b	<i>seg-sei-sem-sen-seo, sea</i>	<i>lukED</i>	<i>egc1, prophage</i>	1		S18
TG6	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu, tst, seh</i>		ν Sa β 2, SaPI2	3		S11
TG7	<i>seg-sei-sem-sen-seo, seb</i>	<i>lukED</i>	ν Sa β 1, other	3		S23-S25
TG8	<i>seg-sei-sem-sen-seo, seb, etd</i>	<i>lukED</i>	ν Sa β 1, others		1	S85
TG9	<i>seg-sei-sem-sen-seo, sec-sel</i>		<i>egc1, SaPI4</i>	7		S31-S33
TG10	<i>seg-sei-sem-sen-seo, sec-sel, sed-sej-ser</i>		ν Sa β 1, SaPI4, pUO-SED1	3		S31
TG11b	<i>seg-sei-sem-sen-seo, sed-sej-ser</i>	<i>lukED</i>	ν Sa β 1, pUO-SED1	2		S42
TG12	<i>seg-sei-sem-sen-seo, seh</i>		<i>egc1, other</i>	1		S61
TG13c	<i>seg-sei-sem-sen-seo-seu, tst-sec-sel</i>	<i>lukED, lukM</i>	ν Sa β 2, SaPIbov, other		10	S80-S82

PFGE analysis (Fig.1) differentiated the isolates into 39 *SmaI*-profiles, 27 generated by H-isolates and 12 from B-isolates. None of the *SmaI*-profiles included isolates from both sets. The control strains generated different *SmaI*-profiles. A dendrogram was constructed on the basis of the coefficient of similarity between *SmaI*-profiles (Fig. 2). At a cut-off point of $S = 0.7$ eight clusters or lineages were revealed (5 H, 2B, and 1 HB).

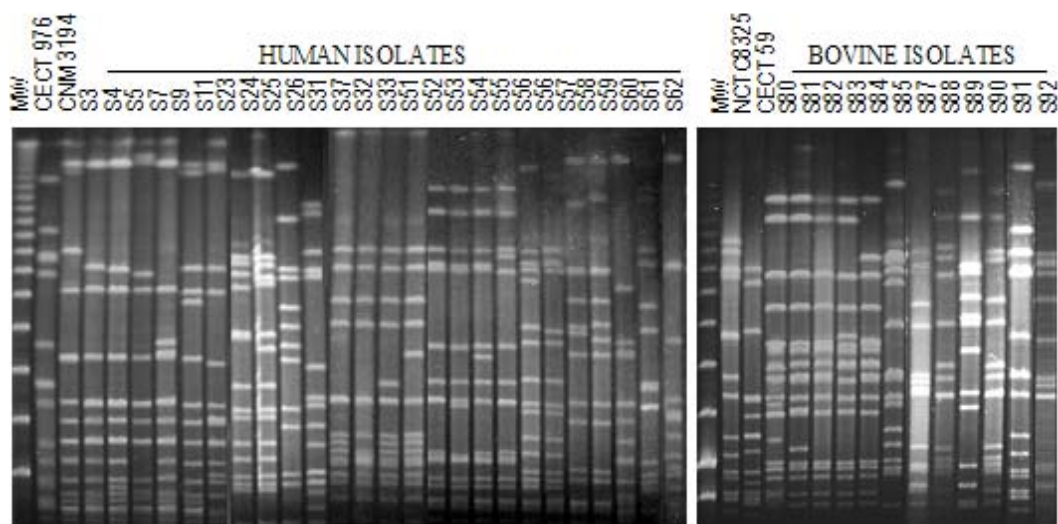


Fig. 1. Macrorestriction genomic profiles generated by *SmaI* in *S. aureus* isolates from human and bovine origin. Lanes MW, Lambda ladder PFGE Markers (New England Biolabs). NCTC 8325, used as quality control in PFGE assays. Fragment size from top to bottom in kb are 674, 361, 324, 262, 257, 175, 135, 117, 80, 60 and < 60. Relationships between TGs and *SmaI* profiles are compiled in Table 1.

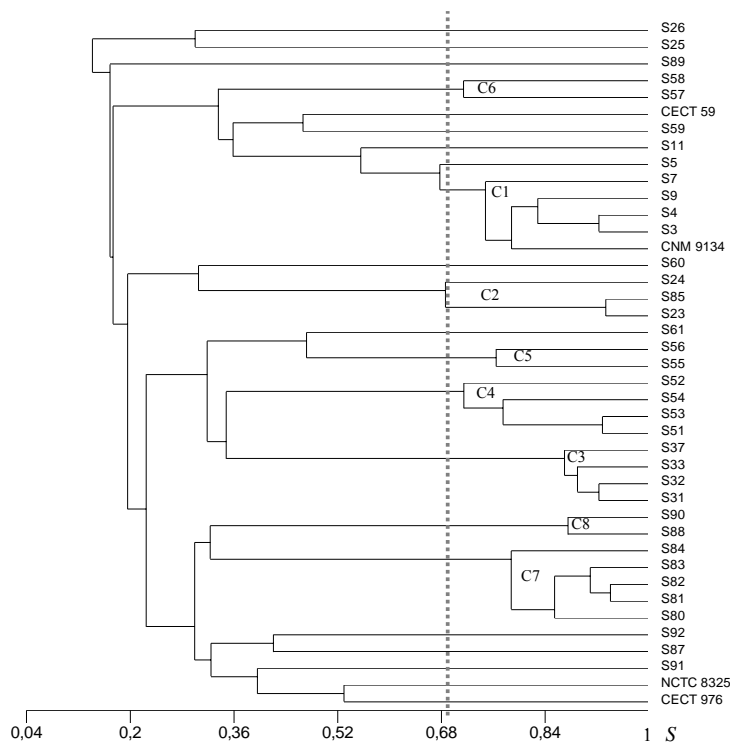


Fig. 2. Dendrogram showing relatedness among *SmaI* macrorestriction fragment profiles generated from *S. aureus*.

Cluster analysis was performed by the Jaccard similarity coefficient (S) and the unweighted pair group method. At a cut-off point of $S = 0.7$, eight clusters (labeled C1 to C8) were revealed. Profiles S3 to S61 and clusters C1 to C6 were generated from human isolates. Profiles S80-S92 and clusters C7 and C8 were generated from bovine isolates. The isolates falling into each cluster and branch, as well as their relationship with TGs, are compiled in Table 1.

Even considering the size of each set (58 vs 38 isolates) the diversity of TGs and *SmaI*-profiles was

remarkably higher in H- than in B-isolates (15 and 27 vs 5 and 12). H-isolates were more frequently positive and carried a higher number of classical SE-genes than B-isolates (32 vs 11, and 5 vs 3, respectively). Conversely, frequency of leukotoxin genes was strikingly higher in B-isolates (100% for *lukED*, and 87% for *lukM*) than in H-isolates (39.7% for *lukED*, 0% for *lukM*, and 1.7% for *lukPV*). This fact could be in relation with the important role of leukotoxins, especially Luke-LukD, in bovine mastitis [4]. On the other hand, H and B -isolates generated *SmaI*-profiles with low similarity (< 25%). As an exception, a single B-isolate showed $\geq 70\%$ similarity with three H-isolates (the four falling into C2, Fig 2). These 4 isolates have also in common that they were (*egcI*, *seb*, *lukED*) positive, but the B-isolate was also *etd*-positive. Presumably, the latter could be of human origin and could have reached the milk through manual manipulation. Also it is noteworthy that 10 bovine isolates, and only these, were *tst-sec-sel* positive, a gene grouping related with SaPIbov [2,3].

These results further support the hypothesis that humans and bovines constitute reservoirs of different sub-populations of *S. aureus* species carrying *egcI*_{like} groupings.

Acknowledgements We thank J. Sierra (Hospital Clínico, Barcelona), A. Vindel (Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Majadahonda, Madrid), and CECT for reference strains; and J. Muñiz (Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias) for bovine isolates. This work has been supported by a grant from the "Fondo de Investigación Sanitaria" PI020172

References

- [1] M.M. Dinges, P.M. Orwin, and M. Schlievert, Clin. Microbiol. Rev. **13**, 16-34 (2000)
- [2] R.P. Novick. Plasmid **49**, 93-105. (2003)
- [3] H. Schmidt, and M. Hensel, Clin Microbiol. Rev. **17**, 14-56 (2004).
- [4] P. Rainard, J.C. Corrales, M.B. Barrio, T. Cochard, B. Poutrel. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **10**, 272-277 (2003).
- [5] S. Jarraud, M.A. Peyrat, A. Lim, et al., J. Immunol. **166**, 669-677 (2001).
- [6] C. Letertre, S. Perelle, F. Dilasser, and P. Fach, Appl. Microbiol. **95**, 38-43 (2003)
- [7] J.M.Fueyo, M.C. Mendoza, M.A. Alvarez, and M.C. Martín. FEMS Microbiol Lett. **243**: 447-54 (2005)
- [8] J.M. Fueyo, M.C. Mendoza, M.R. Rodicio, J. Muñiz, M.A. Alvarez, and M.C. Martín, J. Clin. Microbiol. **43**:1278-1284 (2005).

IV. DISCUSIÓN

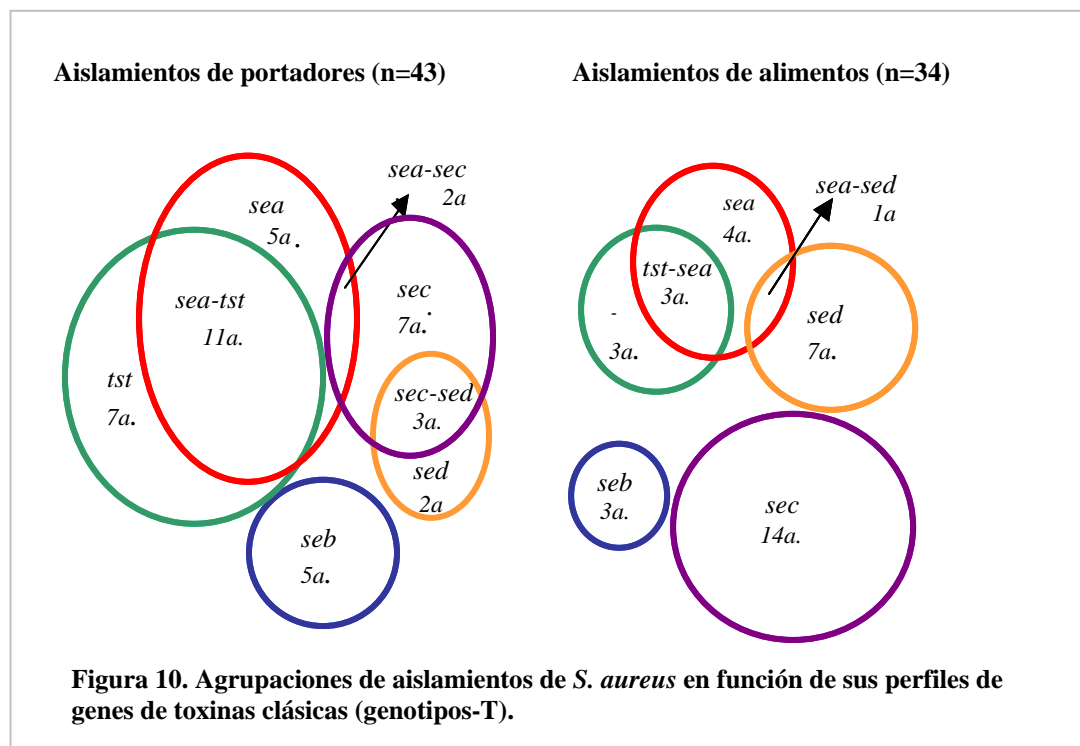
IV. 1. OBJETIVO 1. Establecer relaciones toxigénicas y genómicas entre *S. aureus* aislados de muestras nasales de portadores sanos y de alimentos manualmente procesados. Determinar la localización cromosómica y/o plasmídica de los genes de las enterotoxinas A-D y de la toxina del síndrome del *shock* tóxico

A lo largo del desarrollo del presente objetivo nos fuimos planteando responder a una serie de preguntas sobre diferentes aspectos de interés epidemiológico y/o genético en relación con aislamientos de *S. aureus* recogidos de muestras nasales de portadores sanos y de alimentos con alguna fase de procesamiento manual -como pasteles, quesos y platos combinados- todos ellos recogidos en Asturias, en diferentes laboratorios de Microbiología, durante los periodos 1995-1999 y 2000-2002. Para abordar el trabajo experimental se optimizaron procedimientos basados en la PCR para la detección de secuencias específicas de genes de toxinas (genotipo-T) y para la tipificación mediante análisis del polimorfismo de secuencias aleatorias (RAPD), junto a otros dos métodos genéticos (análisis de macrorrestricción genómica-PFGE y perfil de plásmidos). Señalar que en 1997, cuando se plantea este trabajo, solamente se rastreaban 5 SEs (SEA-SEE) y la TSST-1, que inicialmente había sido descrita como una sexta enterotoxina, SEF [Bergdoll et al., 1981], aunque ya se había emitido la hipótesis, y existían algunos datos, de que podrían existir otras toxinas [Jay, 1993; Su y Wong, 1997; Mossel et al, 1995; Rosec et al.1997]. El estudio se hizo en dos fases (Artículos 1 y 2) pero los resultados son discutidos de forma conjunta.

IV.1.1 ¿Cuál es la proporción de aislamientos productores de los tipos clásicos de ETs y/o TSST-1 o portadores de sus genes?. En una primera fase se analizaron 224 aislamientos (en adelante *a.*) para la detección de SEA-SEE recogidos entre 1995-1999 (Artículo 1), y en una segunda fase se añadieron otros 45*a.* recogidos entre 2000-2002 (Artículo 2). En esta segunda fase, los 269*a.* se analizaron para TSST-1. Como cepas control se utilizaron las recopiladas en la Tabla 2 (Artículo 1) y Figura 1 (Artículo 2). Previamente, se había confirmado que todos los aislamientos eran productores de coagulasa, lecitinasa, termonucleasa, y hemolisinas. Ya se ha indicado que estas enzimas degradan macromoléculas y facilitan a los estafilococos la colonización de diferentes ambientes, siendo además caracteres utilizados para la identificación de la especie. La producción de SEA-SED y de TSST-1 (fenotipo-T) fue confirmada mediante un sistema comercial de aglutinación Ag-Ac en fase reversa, utilizando partículas de latex con Ac específicos de toxina (SET-RPLA y TST-RPLA, de Oxoid) mientras que la presencia de los genes *sea-see* y *tst* (perfil de genes de toxinas, genotipo-T, ó GT) mediante PCR convencional con iniciadores diseñados en nuestro y otros laboratorios (Anexo 3).

Todos los aislamientos fueron negativos para el gen *see*, mientras que porcentajes del 21,2; 3,7; y 3,7 fueron positivos para alguna de las cuatro SEs, TSST-1 o ambos tipos, y portaban los correspondientes genes. Además, 4*a.* SEA-positivos/TSST-1-negativos portaban el gen *tst*. Los aislamientos toxigénicos representaban el 31,2% de los procedentes de portadores y el 26% de los de alimentos. Las cinco toxinas (y sus genes) aparecían con distinta frecuencia y en diferentes combinaciones, siendo SEA y SEC predominantes (33,8 %). SEA se encontró como única toxina, o junto a TSST-1, SEC o SED; siendo más frecuente en aislamientos humanos que de alimentos (16 vs. 10; estadísticamente no-significativo, $P = 0.1006$). SEC aparecía mayoritariamente sola, y en una minoría de casos junto a SED o SEA, con frecuencias similares en aislamientos humanos y de alimentos (12 vs. 14), pero sólo en los primeros junto a otras SEs. La tercera toxina en frecuencia, TSST-1 (31,2%, incluyendo todos los *tst*-positivos), aparecía sola o junto a SEA, y más frecuentemente en aislamientos humanos que de alimentos (21 vs. 3; diferencia estadísticamente significativa, $P = 0.0001$). Seguía en frecuencia SED (16,9 %) sola, con SEA, o con SEC; y en quinta y última posición SEB (10,4 %) que siempre aparecía

sola. En la Figura 10 se muestra una representación esquemática de los distintos perfiles de genes de toxinas en relación al número de aislamientos encontrados tanto en portadores como alimentos.



Las cepas controles CECT 976-SEA y 4459-SEB, además de las toxinas para las que son prototipos, producían SED y SEA, respectivamente.

Cuando nuestros datos fueron contrastados con los de otros estudios se constató que los porcentajes en aislamientos humanos, aunque considerables, eran menores que los publicados, tanto para SEs, 36-46% [Hatakka et al., 2000; Roder et al., 1995; Larsen et al., 2000; Peacock et al., 2002; Becker et al., 2003] como para TSST-1, 19-40% [Daghistani et al., 2000; Hatakka et al., 2000; Larsen et al., 2000; Peacock et al., 2002; Becker et al., 2003; Uemura et al., 2004]. Mientras que los porcentajes en cepas de alimentos eran muy variables por encima y debajo de los nuestros [Le Loir et al., 2003; Rosec et al., 1997; Atanassova et al., 2001]. En nuestro estudio, también se observó que aunque parte de los aislamientos SEC-positivos procedían de alimentos derivados de leche (queso y pasteles de crema) ninguno de ellos era TSST-1 positivo. Recordar que SEC/TSST es la combinación codificada por SaPIbov y a su vez asociada a *S. aureus* de origen bovino [Fitzgerald et al., 2000, 2001; Novick, 2003; Schmidt y Hensel, 2004]. También son de señalar que en nuestra serie TSST/*tst* aparecía sólo o en combinación con SEA/*sea*, y que esta última asociación ha sido detectada en alta frecuencia en cepas de origen humano tanto de portadores como implicadas en infecciones diversas [Peacock et al., 2002; Becker et al., 2003].

IV.1.2 ¿El grupo de *S. aureus* toxigénicos es genéticamente homogéneo o heterogéneo?. ¿Existe correlación entre perfiles de toxinas y polimorfismos del ADN?. Para responder a esta doble pregunta en la primera fase aplicamos la técnica RAPD a dos vías (Artículo 1) y en la segunda fase el

análisis de macrorrestricción-PFGE (Artículo 2), combinándose en ambos casos los resultados con el fenotipo-T/genotipo-T.

Mediante RAPD los 110a. humanos, los 114a. de alimentos y las 6 cepas control se diferenciaron en 10 RAPD tipos, y el método generó un índice de discriminación de Simpson (ID) = 0,68. La relación entre perfiles-RAPD se determinó mediante el coeficiente de similitud (S) de Dice, encontrando valores entre 0,94 y 0,4. Tres de los RAPD tipos incluían cepas toxigénicas y cepas no-toxigénicas, y otros tres eran generados por aislamientos humanos y de alimentos. La relación más sobresaliente era la del perfil-RAPD S4C3 con la toxina SEC (17a. SEC y 4a. SEC-SED).

Mediante macrorrestricción con *SmaI*-PFGE (considerando los fragmentos entre 25-800 kb; los tamaños de los fragmentos de ADN que se citan de aquí en adelante son aproximados) sólo se analizaron los 77a. toxigénicos que se diferenciaron en 36 perfiles-*SmaI*, junto a 7 cepas control que generaron otros 7 perfiles-*SmaI* (Fig. 1 y 2, Artículo 2). El procedimiento presentó un excelente poder de discriminación tanto incluyendo ($DI= 0,94$) como no incluyendo ($DI= 0,93$) las cepas control. Los perfiles-*SmaI* se relacionaron con los genotipos-T y se hicieron agrupaciones para establecer relaciones y similitudes. Utilizando dos criterios, el número de fragmentos no alineados (≤ 6) y el coeficiente de similitud de Dice ($S \geq 0,7$), algunos perfiles formaban agrupamientos o clusters, y los aislamientos que generaban perfiles englobados en un cluster fueron considerados como pertenecientes a un mismo. En total se diferenciaron 8 linajes (L1-L8) y siete perfiles no-agrupados (Fig. 1, Artículo 2), que aparecían en diferente frecuencia. Es de hacer notar que aunque al nivel de perfil-*SmaI* sólo tres incluían aislamientos humanos y de alimentos, al nivel de linaje-*SmaI* eran seis los que lo hacían. Además, cada linaje mostraba una clara relación con determinados genotipos-T (L1 con *tst* y *sea-tst*; L2 con *tst*; L3 con *sea* y *sea-sec*; L4 y L5 con *seb*; L6 con *sec* y *sec-sed*; L7 y L8 con *sed* y *sed-sea*).

Los dos linajes más frecuentes podrían considerarse endémicos dado que incluían aislamientos recogidos a lo largo del período 1996-2002: L1 agrupaba 8 perfiles-*SmaI* y 19a., mientras L6 agrupaba 4 perfiles-*SmaI* y 22a. En L6, el perfil S31 era claramente el más frecuente con 18a., dos de ellos recuperados de alimentos representaban a organismos implicados en dos brotes de toxoinfección alimentaria ocurridos en diferentes años, 1998 y 2002. Un tercer linaje, L3 agrupaba tres perfiles y en uno de ellos se incluían, también, aislamientos recogidos de alimentos implicados en otro brote en 2002 (Apartado III.2 y Artículo 3).

La elevada heterogeneidad genética de la especie *S. aureus* revelada por los tres procedimientos (genotipo-T, RAPD y PFGE) está en línea con la publicada, utilizando éstos u otros métodos [Tsen et al., 1997; Suzuki et al., 1999; Wei y Yang, 2000; Ataca et al., 2000; Peacock et al., 2002; Becker et al., 1998 y 2003; Murchan et al., 2003]. Sin embargo la clara relación entre determinados perfiles-RAPD y perfiles-*SmaI*, y de ambos con determinadas toxinas o genotipos-T es una observación de primera descripción.

IV.1.3 ¿Los genes que codifican las cinco toxinas bajo estudio son de localización cromosómica o plasmídica?. ¿La localización es acorde con la publicada?. Para poder responder a esta nueva doble pregunta fue necesario llevar a cabo diferentes experimentos de forma secuencial. En primer lugar se localizaron los 5 genes en los perfiles de macrorrestricción genómica mediante hibridación utilizando la técnica de Southern, y sondas gen-específicas obtenidas por PCR a partir de las cepas prototipo. Las hibridaciones (Artículo 2, Fig. 1 y 2) mostraron que cada una de las 5 sondas mapeaban en diferentes fragmentos. Hecho que sugiere que los cinco genes están separados a lo largo del genoma, incluso en aislamientos con genotipos-T incluyendo dos genes.

La sonda *sea* hibridaba con fragmentos de al menos ocho tamaños, dos de ellos pertenecientes a perfiles agrupados en L1 y otros dos en L3. La sonda *tst* hibridaba con fragmentos de cuatro tamaños, uno de ellos de 85 kb alineado en 11 de los 12 perfiles generados por cepas TSST-1. De estos perfiles siete y tres estaban incluidos en L1 y L2, respectivamente, y aunque un fragmento de 85 kb se observaba, también, en el octavo perfil-L1 la sonda *tst* hibridaba en un fragmento diferente de 230 kb. Estos hechos sugieren, pero no confirman, que organismos de un mismo linaje han podido ganar diferentes elementos genéticos de origen fágico que codifican SEA o TSST-1 que se han insertado en diferente posición en el cromosoma; o que diferentes cepas de un mismo linaje han ganado un mismo elemento genético, pero que éste se ha insertado en un sitio diferente del cromosoma. El primero de estos supuestos se ve apoyado por los datos recogidos en un artículo de reciente publicación [Gill et al., 2005] en el que el número y tipo de islas genómicas en cuatro cepas de *S. aureus* (Mu50, N315, MW2 y COL) ha sido comparado. En ninguna de las PAIs los genes *tst* y *sea* aparecen conjuntamente, aunque cada uno de ellos se presenta asociado con otros genes de toxinas. Si sumamos a estos datos los obtenidos en la secuenciación de genomas parciales incluyendo SaPIs, encontramos que, hasta la fecha, el gen *tst* se ha encontrado inserto en diferentes islas (SaPI1/vSa1, SaPIbov/vSa2, SaPI2/vSa4, SaPIm1 y SaPIin1/vSa4) flanqueadas por secuencias *att* y portadoras de genes fágicos que codifican integrasas, helicasas, y terminasas [Fitzgerald et al., 2001; Novick, 2003; Schmidt y Hensel, 2004, Gill et al., 2005]. En cuanto al gen *sea*, han pasado dos décadas desde que fue relacionado con una familia polimórfica de bacteriófagos temperados (profagos) de *S. aureus* [Betley y Mekalanos, 1985], y en los últimos años se está demostrando que uno de estos profagos, Φ Sa3, está presente en los genomas de diferentes cepas de origen humano, todas ellas implicadas en infecciones sistémicas graves [Kuroda et al 2001, Baba et al 2002; Sumby y Waldor, 2003; Gill et al 2005].

La sonda *seb* hibridaba con fragmentos genómicos de tres tamaños: 324 kb, en los perfiles agrupados en L4; 300 kb, en el perfil no-agrupado S25; y mayores de 674 kb en el perfil de la cepa SEB-prototipo (CECT 4459). No se observaron señales de hibridación en los dos perfiles que forman L5, un hecho que sugiere por un lado que el soporte genético de *seb* es diferente en estos aislamientos respecto a los anteriores y por otro lado que *seb* podría estar localizado en un fragmento de pequeño tamaño y no visible. Para confirmar estas sugerencias se requiere experimentación adicional. Actualmente está demostrada la inserción de *seb* en una isla de patogenicidad, SaPI3 (Yarwood et al., 2002).

La sonda *sec* hibridaba con el fragmento de mayor tamaño (> 800 kb) de tres de los perfiles agrupados en L6, y en cuatro fragmentos de menor tamaño en otros perfiles. Dado que *sec* ha sido descrito en diferentes SaPIs [Fitzgerald et al., 2001; Baba et al., 2002; Novick 2003; Schmidt y Hensel, 2004, Gill et al., 2005], tanto en cepas de origen humano como bovino, caben aquí comentarios similares a los realizados para SEA y TSST-1. Recordar que ninguno de los aislamientos SEC producía TSST-1, combinación característica de SaPIbov, presente en cepas de origen bovino [Fitzgerald et al., 2001].

Por último, indicar que la sonda *sed* era la única que hibridaba con dos fragmentos de un mismo perfil, y que estos fragmentos tenían un tamaño similar (320 kb y 33-36 kb) en todos los perfiles generados por cepas tanto SED, como SEC/SED o SEA/SED, con la excepción de un perfil (S41 generado por dos cepas de alimentos), en el que hibridaba sólo en un fragmento de 53,5 kb. Desde hace tres lustros está establecido que el gen *sed* es de localización plasmídica, considerándose como plásmido prototipo al primero descrito (pIB485 de 27,6 kb) y parcialmente secuenciado [Bayles y Iandolo, 1989; Zhang et al., 1998; Omoe et al., 2003]. Nuestros resultados de las hibridaciones de la sonda *sed* con los perfiles SmaI mostraban que en adición a un fragmento de un tamaño cercano (33-36 kb) al del plásmido prototipo, otros dos fragmentos de mayor tamaño (53,5 y 330 kb) portaban *sed*, y que en base al tamaño sólo el primero podría ser plasmídico.

Para confirmar que los fragmentos *sed*-positivos de tamaño cercano al del plásmido prototipo, y determinar si alguno de los otros fragmentos de mayor tamaño correspondía a plásmidos, se pasó a analizar el contenido plasmídico de los aislamientos toxigénicos y de las cepas control. Inicialmente se procedió a la extracción de plásmidos mediante lisis alcalina con lisostafina y separación por electroforesis convencional en geles de agarosa. Sólo a partir de 41 de los 77 aislamientos (53%) se logró determinar la presencia de plásmidos y éstos aparecían casi siempre en dos o más bandas de diferente intensidad. Este hecho sugería que en adición a la forma “circular, superenrollada, y enlazada covalentemente”, otras formas (círculos relajados y moléculas lineales) podían, también, estar presentes y no aparecían en todas las extracciones de un mismo aislamiento. Para optimizar esta prueba, se procedió a digerir con *EcoRI* el contenido total de plásmidos de cada uno de los aislamientos positivos. En este caso el perfil de restricción plasmídico (PRP) generado por cada aislamiento fue siempre el mismo, y los 41a. pudieron diferenciarse en los 13 PRPs (*E1-E13*) mostrados en el Artículo 2, Fig.3. Tanto el número de aislamientos con plásmidos como el número de perfiles *EcoRI* podría ser menor del dado, debido a que algunas de las extracciones podían haber generado falsos-negativos. Considerando a organismos sin plásmidos como un perfil (*E0*) el método generaba un $ID= 0,74$ (datos no mostrados).

Por otro lado, se demostró que existían algunas correlaciones entre PRPs y tipo toxina producida, por ejemplo: *E1-E5* con SEA; *E6-E8* con SEB; *E9-E10* con SEC; *E11* con SEC-SED; *E12- E13* con SED; y 23 de las 24 cepas positivas para TSST/*tst* carecían de plásmidos. También se estableció una cierta relación entre los perfiles *EcoRI*, representados por dos o más aislamientos, perfiles genómicos *SmaI* y tipo de toxina, destacando: *E9* con *S31a* y SEC; *E3* con *S14* y SEA; *E11* con *S31b* y SED/SEC; *E13* con perfiles incluidos en L8 y SED; y cepas sin plásmidos con los linajes L1 y L2 y TSST-1 ± SEA (Artículo 2, Tabla 1).

Cuando los perfiles plasmídicos *EcoRI* se hibridaron con sondas para las cinco toxinas los resultados mostraron que sólo la sonda-*sed* hibridaba, y lo hacía con fragmentos de tres PRPs (*E11-E13*) que correspondían a organismos SED (Artículo 2, Figura 3). El tamaño de los fragmentos era de 5,3 kb en *E11* y *E13* y 10 kb en *E12*. El paso siguiente fue digerir con otra endonucleasa, *HindIII*, el contenido plasmídico de los 41a. obteniéndose una distribución de aislamientos en PRPs idéntica, aunque la sonda-*sed* hibridaba sobre un fragmento de diferente tamaño en los tres perfiles.

Está descrito que el plásmido prototipo, pIB485 [Bayles y Iandolo, 1989], porta en adición a *sed* otros dos genes (*sej* y *ser*) que codifican enterotoxinas [Zhang et al., 1998; Omoe et al., 2003]. La localización de estos tres genes en nuestros plásmidos se verificó mediante diferentes ensayos tanto en los aislamientos como en las dos cepas control *sed*-positivas (CECT 976-SEA y 4466-SED). La amplificación con los iniciadores *sej* y *ser* mostró que todos los aislamientos, a excepción de 2a. recogidos de alimentos, generaban amplicones del tamaño esperado, indicando la presencia de ambos genes. Las dos excepciones correspondían a aislamientos con perfiles de macrorrestricción genómica *S41* y plasmídicos *E12/H12* en los que el gen *ser* no pudo ser amplificado. La hibridación de los PRPs y los perfiles-*SmaI* con las sondas *sej* y *ser* confirmó la mayoría de los datos de amplificación y mostró que ambas sondas hibridaban en aquellos fragmentos en los que previamente lo había hecho *sed*, con la excepción de la sonda *ser* que, además, lo hacía en otros fragmentos en los PRPs, *E12* y *H12*. Estos PRPs eran generados por el plásmido de 53,5 kb de los dos aislamientos cepas *ser*-negativos por PCR. Por otro lado, el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *ser* no reveló sitios de reconocimiento y corte para *HindIII* ó *EcoRI*.

El análisis de plásmidos mediante linearización con *S1* y separación mediante PFGE [Barton et al., 1995] seguido de hibridación con las sondas *sed*, *sej* y *ser* reveló la presencia de dos plásmidos de 33 kb y 36 kb portando los tres genes, y un tercer plásmido de 53,5 kb con *sed-sej-ser*_{like}. Cada uno de

estos plásmidos generaban perfiles de restricción bien definidos -E13/H13, E11/H11, y E12/H12-, respectivamente (Artículo 2, Figura 3). Los tres plásmidos se denominaron utilizando las siglas pUO-SED (plásmidos de la Universidad de Oviedo, SED) y un número de orden: pUO-SED1 (de 33 kb, y PRPs similares o idénticos a pIB485); pUO-SED2 (36 kb y PRPs similares pero no idénticos a pIB485); y pUO-SED3 (53,5 kb, y PRPs muy diferentes a pIB485).

IV.1.4 ¿Podría ser la información obtenida aplicable a fines de interés epidemiológico?. La respuesta es afirmativa, y en parte ha sido respondida en párrafos previos cuando se han discutido aspectos genéticos. Otros datos relevantes tanto en el campo de la Salud Pública como de la Microbiología Alimentaria podrían ser los siguientes:

- i) Seis de los ocho linajes representados por aislamientos humanos incluían también aislamientos recuperados de alimentos. En dos linajes se englobaban organismos SEA o SEC implicados en brotes de toxi-infección alimentaria (Artículo 3). Estos datos podrían ser de interés dado que existe poca evidencia de la ruta de transmisión completa de la intoxicación estafilocócica del tipo “manipulador de alimentos-alimentos manipulados-línea de pacientes” [Suzuki et al., 1999; Balaban y Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003; Hatakka et al., 2000; Tsen et al., 1997; Wei y Yang, 2001; Wei y Chiou, 2002].
- ii) Al menos cuatro linajes incluyendo, respectivamente, organismos [TSST-1 y TSST-1/SEA], [TSST-1], [SEA y SEA-SEC] y [SEC y SEC/SED] podrían considerarse endémicos en Asturias porque se han encontrado como colonizadores de la mucosa nasal de personas sanas que vivían en la región entre 1996-2002. También se han encontrado en distintos tipos de alimentos recogidos en diferentes momentos del período y no relacionados con los portadores sanos, y los dos últimos incluían los aislamientos asociados a brotes ya citados.
- iii) El conocimiento preciso de los linajes endémicos y epidémicos de *S. aureus* toxigénicos requiere de una investigación más intensa y sistemática, pero los datos derivados de este apartado nos han servido de referencia para los siguientes objetivos de esta Tesis. Además, podrían servir también de referencia para estudios prospectivos de este patógeno en Asturias y para la comparación de tipos toxigénicos y genómicos recogidos en otras áreas geográficas, fuentes y períodos de tiempo.
- iv) En España la intoxicación alimentaria por *S. aureus* rara vez se registra, debido en parte a que el número de incidentes diagnosticados a nivel microbiológico es bajo. Por otro lado, no tenemos constancia de que el análisis del vómito de las personas sospechosas de sufrir intoxicación sea una práctica en uso en el diagnóstico. Los brotes usualmente se diagnostican basándose en el aislamiento de *S. aureus* DNasa positivo en alimentos sospechosos y/o manipuladores. Información relevante sobre la incidencia de las intoxicaciones estafilocócicas se recoge en “The 8th Report of the WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe” (<http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threpintro.htm>), del que pudimos recopilar que durante el bienio 1999-2000 se declararon más de 3.700 incidentes (casos esporádicos y brotes) de intoxicación estafilocócica. El número real de incidentes podría ser mucho mayor debido a que, como ya se ha indicado, no todos los incidentes se declaran y en agosto de 2004 algunos países, incluido España, no tenían registrados sus datos.

IV.2. OBJETIVO 2. Aplicar y evaluar métodos genéticos al diagnóstico microbiológico de brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus*.

El Servicio de Epidemiología del PA registró, en el período junio-octubre de 2002, tres brotes (B1, B2 y B3) de intoxicación alimentaria asociados a *S. aureus*, sin relación epidemiológica aparente

entre ellos. Cada brote ocurrió en un restaurante, en días diferentes: B1 el 11 de junio con 54 afectados; B2 el 5 de octubre con 27 afectados y B3 el 26 de octubre con 70 afectados. No se analizaron muestras de vómitos o heces de los afectados, pero sí de alimentos sospechosos y exudados nasales de personal manipulador. En los tres casos se aislaron, en los Laboratorios de Salud Pública (LSPs), *S. aureus* tanto de algunos de los alimentos consumidos por los enfermos como del personal de cocina implicado en su elaboración. Parte de los aislamientos fueron remitidos a nuestro laboratorio para que definiésemos las cepas implicadas mediante técnicas de análisis de ADN y la posible relación entre aislamientos del personal de cocina y alimentos.

Este apartado de la Tesis se centró en valorar el potencial enterotóxico, y los tipos genéticos de *S. aureus* recogidos en los tres brotes, con el fin de establecer las relaciones epidemiológicas entre aislamientos de manipuladores y de alimentos solicitadas; así como entre aislamientos de los diferentes brotes y respecto a otros no asociados a brotes previamente identificados por nuestro grupo de trabajo. La producción de las cuatro enterotoxinas clásicas, SEA-SED, se valoró con los sueros SET-RPLA de Oxoid, y la presencia de los genes *sea-see*, y *seg-sej* mediante PCR simple y múltiple. Es de señalar que en España, ésta era la primera vez en aplicar técnicas de Epidemiología Molecular al estudio de brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus*. Además, el abordaje de la valoración de nueve genes-*se* se podría considerar “pionero”, pues la propuesta de las secuencias a utilizar como iniciadores de los genes *seg-sei* hacía poco que se habían publicado [McLauchlin et al., 2000]. Los resultados se recogen en el Artículo 3.

Antes de entrar a discutir los resultados se debe indicar que durante la realización-redacción del Artículo 3, de continuo aparecía la publicación del descubrimiento de nuevas enterotoxinas a partir de secuencias de sus genes [Orwin et al., 2001, 2002, 2003; Becker et al., 2003], así como las localizaciones de algunos de éstos y otros genes en islas genómicas [Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002, revisado por Novick, 2003]. Además, se había descubierto la organización de cinco genes (*seg-sei-sem-sen-seo*) y dos pseudogenes en un operón que funciona como “guardería” de genes al que denominaron *egc* (*enterotoxin gene cluster*) [Jarraud et al., 2001]. Dos años más tarde se publicó una variante de *egc* con un sexto gen, *seu*, que procedía de una inserción de 15 kb en uno de los pseudogenes de *egc* [Letertre et al., 2003] y la existencia de un nuevo gen, *ser*, que codifica otra toxina, SER y que junto con *sed-sej* forma un agrupamiento de localización plasmídica [Omoe et al., 2003]. Las toxinas codificadas por estos genes de nueva descripción son pirogénicas y superantigénicas pero no está bien establecido su potencial emético en monos, por lo que se consideran posibles SE (*putative* SE). Según es sugerido en una comunicación del Comité Internacional para la Nomenclatura de Supeantígenos Estafilocócicos, todas las SE en las que no haya sido probada su actividad emética deberían ser designadas como “Staphylococcal Enterotoxin-like” (SEL) [Lina et al., 2004]. Debido a su reciente publicación nuestro trabajo no recoge estos cambios de nomenclatura, aunque a su vez quiere dejar constancia de su existencia.

Esta nueva información nos llevó, con posterioridad a la publicación del Artículo 3, a ampliar el estudio incluyendo la detección de otros nueve genes (*sek-seq* y *ser*) en los 32a. asociados a los brotes B1-B3. Además, analizamos en cepas SEC el gen *tst* por su presencia conjunta en las islas SaPIbov y SaPI2 que forman parte de la familia ν Sa1-4 [Schmidt y Hensel, 2004]; y en cepas *egc*, secuencias específicas de los genes *lukED* (que codifican la leucotoxina bi-componente, LukE-LukD) dado que forman parte, junto al operon-*egc* (con y sin *seu*) y otras secuencias, de la isla ν Sa β [Baba et al., 2002] (Apartado I.2.1, Figuras 5a y 5b). El objetivo final era poder hacer una aproximación a los soportes genéticos de las SEs implicadas en los brotes. Los resultados se recogen en el Anexo-1 y fueron presentados en una comunicación en el XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos [Fueyo et al., 2004].

IV.2.1. Identificación de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* implicadas en tres brotes comunitarios de intoxicación alimentaria. Los *tests* inmunológicos mostraron que de los 32a. de *S. aureus* asociados a los tres brotes (B1-B3) 5, 1 y 18 eran positivos para SEA, SEB o SEC, respectivamente. Mediante técnicas genéticas los 32a. se diferenciaron en 7 genotipos-T, 13 PFGE-, 7 RAPD- y 9 PRP-perfiles (Figuras 1-3, Tabla 1 y “Tabla Anexo-1” del Artículo 3). Los aislamientos con características idénticas fueron considerados una misma cepa. En total se diferenciaron 15 cepas (12 *se*-positivas y 3 *se*-negativas), todas ellas específicas de brote, excepto la cepa 8 que se detectó en dos brotes (B2 y B3).

En B1, los aislamientos de manipuladores y los de alimentos no pertenecían a las mismas cepas. Los 16a. de alimentos producían SEC y generaban el mismo perfil de genes toxigénicos: eran positivos para *sec*, *seg*, *sei*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo* y *lukED* pero eran *tst*-negativos. Además, generaron idénticos perfiles genéticos con cada uno de los otros tres métodos de tipificación (PFGE, RAPD, y PRP), siendo por tanto considerados como una única cepa (cepa-3), que se diferenciaba claramente de las dos cepas encontradas en los manipuladores. Basándose en el perfil de genes que codifican toxinas, la cepa-3 podría portar dos SaPIs: SaPI4 (*sec-sel-sem*), y vSaβ (*seg-sei-sem-sen-seo-luke-lukD*) [Novick, 2003; Schmidt y Hensel, 2004]. En conjunto, estas dos islas, suman 8 genes-SE, hecho que apoyaba su papel como agente causal de la intoxicación. Organismos con los mismos perfiles de toxinas y huellas genéticas idénticas o similares se han aislado a partir de muestras nasales de portadores sanos a lo largo del periodo 1997-2002 en diferentes laboratorios de Asturias. Además, aislamientos de alimentos con características idénticas habían sido asociados a un brote familiar registrado en 1998 (Artículo 2). Es remarcable que, aparentemente, esta cepa pertenece a un linaje de *S. aureus* pandémico, dado que organismos SEC con perfiles *SmaI*-similares se han descrito como causantes de brotes de intoxicación alimentaria en Taiwan [Chiou et al., 2000] y Japón [Suzuki et al., 1999].

En B2 se diferenciaron 5 cepas y no se pudo establecer relación genética entre ellas. Al menos tres de estas cepas podrían estar implicadas en los cuadros de intoxicación: cepa-8 productora de SEA, cepa-9 productora de SEC y genotipo *egc/vSaβ* + *sec* (pero *sel-sem*-negativa), y cepa-7 con genotipo *egc2/vSaβ* + *seh*. Si se tiene en cuenta que *egc2* porta seis genes-*se*, en conjunto las tres cepas suman un total de 9 genes-SE, cinco de ellos presentes en dos de las cepas. Al igual que en el caso anterior eran datos que apoyan el papel de alguna o todas estas cepas en la intoxicación.

En B3 se identificaron 8 cepas, y en concreto una de ellas, cepa-8, producía SEA y se encontró en alimentos y un manipulador (así como en dos manipuladores del B2). Hecho que apuntaba al manipulador (al hombre en general) como reservorio y fuente de transmisión a los alimentos de la cepa-8. En alimentos se encontraron, además, otras 4 cepas (números 12-15) con un mismo genotipo-T, asociado a vSaβ, que incluye cinco genes-SE. Cabe pensar, que estas cuatro cepas podrían, junto a la cepa-8, estar implicadas en la intoxicación. Atendiendo al polimorfismo de los perfiles-*SmaI*, las cepas 12-15 corresponden a un linaje mientras que la cepa 8 corresponde a otro linaje. Ambos son linajes de origen humano considerados endémicos en el PA, dado que organismos productores de SEA y huellas genéticas idénticas o similares se han aislado a partir de muestras nasales de portadores sanos a lo largo del periodo 1997-2002 en nuestro laboratorio (ver próximo apartado y Artículo 4). De nuevo se debe remarcar que el linaje que incluye la cepa-8, al menos, podría ser pandémico dado que organismos SEA con perfiles *SmaI*-similares se han descrito como causantes de al menos un brote en Taiwan [Wei y Chiou, 2002] en el que se pudo diagnosticar que un manipulador era la fuente de infección.

Comparando los genotipos-T y los perfiles-*SmaI* de los aislamientos presentes en los alimentos con los generados por aislamientos de portadores nasales analizados en nuestro laboratorio se encontró que, además de las dos cepas citadas en párrafos anteriores (cepa-3 relacionada con B1 y cepa-8 relacionada con B2 y B3), en B3 se identificaron otras cuatro cepas con el denominador común de ser portadoras de los cinco genes de enterotoxinas (*seg-sei-sem-sen-seo*) que forman la agrupación *egc* [Jarraud et al., 2001; Baba et al., 2002]. Estas cuatro cepas generan perfiles genómicos *SmaI* idénticos o muy parecidos a aislamientos de *S. aureus* que forman parte de la microbiota nasal de portadores sanos (Artículo 4, Figura 1 perfiles S51-S53). Todos estos datos apuntan a los manipuladores de los alimentos como posible reservorio y fuente de transmisión de una gran parte de las cepas de *S. aureus* aparentemente implicadas en los tres brotes.

IV.2.2. Evaluación de los cuatro métodos genéticos utilizados como marcadores epidemiológicos en el diagnóstico de brotes de intoxicación alimentaria. Como resultado de la evaluación de los cuatro métodos genéticos utilizados como marcadores epidemiológicos en el diagnóstico de brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus* se pueden apoyar las conclusiones siguientes. 1) La efectividad de los cuatro métodos (genotipo-T, RAPD, PFGE y perfil de restricción de plásmidos) en la identificación-diferenciación de cepas. Estos métodos pueden ser utilizados por separado o en diferentes combinaciones, obteniéndose una mayor precisión y un poder de discriminación más elevado con el uso combinado de los cuatro. 2) El genotipo-T ó perfil de genes de toxinas debería ser el método primario en todos los casos. En futuros estudios de incidentes de intoxicación por *S. aureus* será importante valorar el mayor número posible de SEs o sus genes, y la PCR-múltiple es un método útil para ello. 3) Nuestra experiencia sugiere que la combinación de elección debería ser genotipo-T con PFGE. Si no se dispone de equipo de PFGE, se pueden utilizar en combinación con el genotipo-T cualquiera de los otros dos métodos (RAPD y/o perfil de plásmidos).

En cuanto a las ventajas e inconvenientes de cada uno de los cuatro métodos, ya se ha indicado que el análisis de macrorrestricción con *SmaI* se considera actualmente como el *gold method* en la tipificación de *S. aureus* y se ha desarrollado un protocolo consenso [Munchan et al., 2003], aunque tiene como inconvenientes para su aplicación en rutina: que es un procedimiento laborioso, en varios pasos, con un tiempo de realización largo (2-4 días), y que requiere de un equipamiento específico y costoso. La gran fuerza de los métodos basados en la PCR es su simplicidad, rapidez y bajo coste. El punto más débil del perfil de genes, sobre todo en PCR-múltiple es la aparición de falsos negativos y en menor frecuencia de falsos positivos. Cuando se sospecha el fallo de los ensayos se deben repetir con los mismos y/u otros iniciadores para el gen rastreado, o verificar su presencia mediante hibridación. En el caso del RAPD el mayor inconveniente es la frecuente obtención de perfiles con bandas adicionales a las inicialmente consensuadas para definir un determinado perfil, debido a amplificaciones inespecíficas que pueden dificultar la comparación de perfiles de diferentes experimentos o laboratorios. Este inconveniente se minimiza analizando simultáneamente (en un mismo gel y bajo idénticas condiciones de electroforesis) los aislamientos con perfiles de dudosa adscripción. El perfil de plásmidos en principio es un método sencillo, de bajo coste y que requiere sólo del equipamiento de electroforesis básico, pero la interpretación de sus resultados puede ser problemática. Esto es debido a fallos en el proceso de extracción que conllevan por un lado a la obtención de falsos negativos y por otro la alta frecuencia en que se pueden generar, además de la forma buscada (circular superenrollada) una o ambas de las otras dos formas posibles (circular desenrollada y abierta). Este segundo inconveniente se elimina realizando una digestión con endonucleasas de restricción estándar o de amplio uso, como las dos utilizadas en nuestro estudio: *EcoRI* e *HindIII*.

IV.3. OBJETIVO 3. Hacer una primera aproximación a los tipos más frecuentes o endémicos de *S. aureus*, con toxinas pirogénicas superantígenos de nueva descripción, en portadores nasales de Asturias.

Datos del estudio del perfil de genes-*se* en cepas asociadas a los brotes junto con trabajos publicados durante 2001-2003 [Jarraud et al., 2001; Rosec y Guiraud, 2002; Omoe et al., 2003; Peacock, et al., 2002; Becker et al., 2003; Mempel et al., 2003], indicaban que la frecuencia de algunas de las enterotoxinas (o sus genes) de reciente descripción era superior a la frecuencia de las toxinas clásicas (SEA-SEE y TSST-1). Respecto a la frecuencia de otras PTSAGs, (las toxinas exfoliativas, ETs, responsables de los síntomas del síndrome de la piel escaldada), en cepas de *S. aureus* de diferente origen, existía una información limitada [Dinges et al., 2000; Peacock et al., 2002; Yamaguchi et al., 2002; Becker et al., 2003; Uemura et al., 2004].

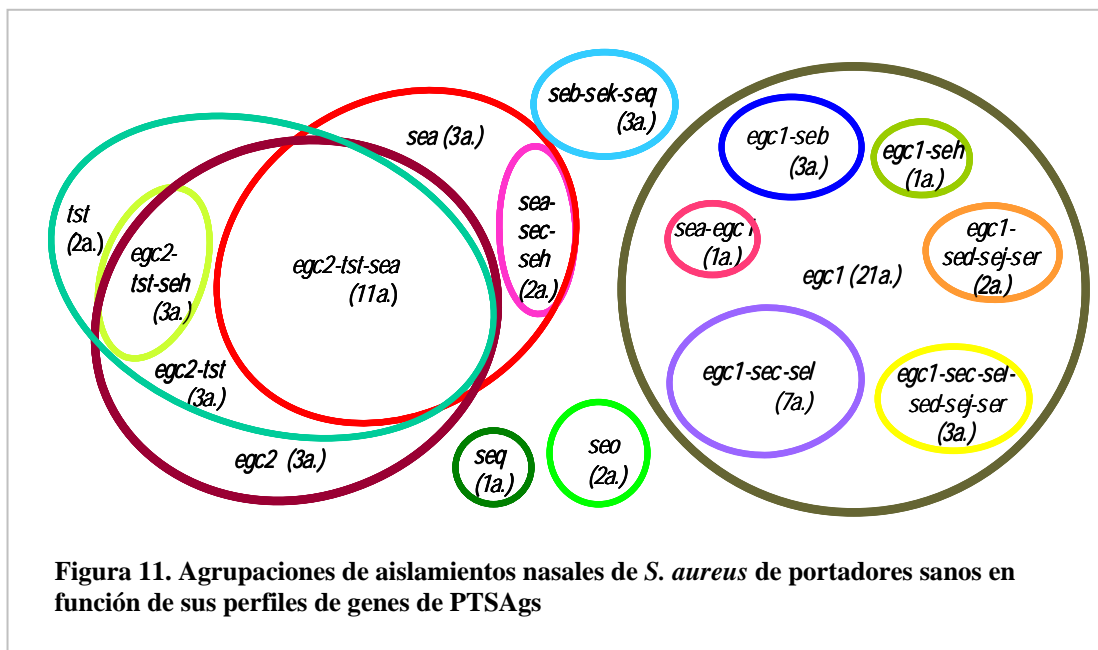
En el presente objetivo nos planteamos hacer una aproximación a la frecuencia de genes-PTSAG, adicionales a los cinco “clásicos” (SEA-SED y TSST-1) valorados en los Artículos 1 y 2, en aislamientos de *S. aureus* colonizadores de mucosa nasal de portadores asintomáticos humanos. Para ello seleccionamos dos grupos de *S. aureus* (ambos incluyendo 43a.), a partir de los guardados en la colección de nuestro laboratorio y analizados en los apartados anteriores: un grupo productor y el otro no productor de PTSAGs clásicas. Los puntos de estudio abordados se pueden englobar en apartados, que siguiendo la misma línea planteada en el Objetivo 1 van dirigidos a responder diferentes preguntas de interés en epidemiología y genética molecular.

III.3.1 ¿Cuál es la proporción de aislamientos conteniendo genes-PTSAG “nuevos”?, ¿cuáles son los genotipos PTSAG de aislamientos productores y no productores de PTSAG “clásicas”?

Para responder a esta doble pregunta se rastrearon 17 genes (*see*, *seg-ser*, *seu*, *eta*, *etb*, y *etd*) mediante PCR simple y múltiple en las cepas control y en los dos grupos de aislamientos nasales previamente analizados para *sea-sed* y *tst*. Como resultado del rastreo de los 17 genes (que por conveniencia para la redacción se designan como “nuevos”) se observó que 6 de las 8 cepas prototipo-PTSAG contenían algún gen-PTSAG, adicional a aquél para el cual son prototipo, y que la cepa control CECT 59, inicialmente considerada como PTSAG-negativa, poseía 6 genes-SE “nuevos”. En los dos grupos de aislamientos nasales (productores y no-productores de toxinas clásicas) se detectó una alta frecuencia de genes-PTSAG “nuevos”, siendo mayor en el grupo con toxinas clásicas (88,4%) respecto del que carecían de ellas (65,1%). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($P= 0.0053$). Otro hecho destacable fue la ausencia en los 86a. de los genes de las exfoliatinas (*eta*, *etb*, *etd*) y de las enterotoxinas *see* y *sep*, así como que en el 23,3% de los aislamientos no se detectó ninguno de los 17 genes-PTSAG “nuevos”.

Cuando estos datos fueron procesados para determinar las interrelaciones entre los diferentes genes se obtuvo el esquema que se recoge en la Figura 11. Probablemente las dos observaciones más sobresalientes están en relación con la frecuencia de cada una de las variantes de *egc*. Primero está la diferente relación de los genes de toxinas “clásicas” con las cada variante: *tst* y *sea* con *egc2* (*seu* positiva); y *seb*, *sec* y *sed* con *egc1* (*seu*-negativa). Segundo, *egc1* y *egc2* aparecen solas (no combinadas con otros genes) en 21 y 3 aislamientos, respectivamente, una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0001$).

Estos datos concuerdan, en parte, con los obtenidos en trabajos previos o paralelos de otros laboratorios, en los que algunos de estos genes “nuevos” (aunque no todos) habían sido rastreados en



aislamientos de portadores nasales, y encontrados en mayor frecuencia respecto de los genes de toxinas clásicas [Omoe et al., 2003, Peacock et al., 2002; Becker et al., 2003 y 2004, Mempel et al., 2003]. Hecho también observado en el estudio de los aislamientos asociados a los tres brotes descritos en el apartado anterior.

A raíz de comparar nuestros resultados con datos publicados en los dos trabajos más importantes sobre el tema [Peacock et al., 2002; Becker et al., 2003] caben destacar los siguientes hechos:

- Mientras que en nuestro estudio no se encontró ningún aislamiento *eta*, *etb* ó *etd* positivo, en los otros dos estudios si se detectaron en aislamientos de portadores sanos los dos primeros genes, aunque en baja frecuencia: 6% y 3% [Peacock et al., 2002] y 1,9% y 1% [Becker et al., 2003], respectivamente, (en ninguno de estos dos estudios *etd* fue rastreado).
- Al igual que en el estudio de Becker et al., (2003) en nuestro laboratorio *sed* aparecía siempre junto a *sej* (y en nuestro caso, ambos a su vez con *ser* o *ser_{like}* y localizados en plásmidos). Por el contrario en el estudio de Peacock et al., (2002), *sej* aparecía en mayor frecuencia que *sed* y por tanto no siempre asociados. En ninguno de estos trabajos *ser* fue buscado ni la posible localización de *sed* y/o *sej* en plásmidos estudiada.
- En los tres estudios, *sea* apareció principalmente asociado a *tst*, aunque en nuestro caso en mayor frecuencia (33,8% vs 14-17%).
- En los tres estudios, la mayor parte de los aislamientos eran positivos para dos o más genes-PTSAg. Ante este hecho, podemos unirnos al postulado de Peacock et al., (2002) a favor de que la acumulación de factores de virulencia en *S. aureus* tendría una respuesta directa con la probabilidad de causar enfermedad. De hecho en su estudio encuentran que la frecuencia de *sea*, *sej* y *eta* (entre otros genes) era mayor en cepas de sangre que nasales, siendo la diferencia estadísticamente significativa.

La información derivada de la investigación sobre la frecuencia de genes-SE de nueva descripción apoya que el rastreo de todas las enterotoxinas (o sus genes) conocidas, al menos duplicaría la probabilidad de detectar cepas enterotoxigénicas respecto a cuando sólo se rastrean las

enterotoxinas clásicas, y que en casos de sospecha de toxinosis se deberían rastrear todos los genes (o sus productos) conocidos.

IV.3.2. ¿El perfil de genes de toxinas podría ser aplicable como marcador de clústeres e islas genómicas con genes-PTSAg en *S. aureus* de origen humano? La respuesta es sí, aunque con reservas. Se constató que varios de los genes-PTSAg aparecían siempre asociados, lo cual indicaba su posible pertenencia a elementos genéticos determinados, otros aparecían solos o en diferentes combinaciones. Son hechos a destacar:

- i) En ambos grupos de aislamientos fue observado un claro predominio de las agrupaciones tipo *egc*, y presumiblemente en asociación a la familia de islas de patogenicidad μ Sa β , aunque en el presente estudio no se valoró la presencia de otros genes que integran la isla como *lukE-lukD* y *spIA-spIF* [Baba et al., 2002; Schmidt y Hensel, 2004; Gill et al., 2005]. En trabajos anteriores de otros autores, también fue observada una alta frecuencia de los genes *seg-sei*, y por tanto se asumía, o podría asumir, la presencia de algún tipo de agrupamiento *egc-like*, en aislamientos asociados a diferentes manifestaciones clínicas (casos de toxemia, infecciones sistémicas e infecciones de la piel o supurativas, así como de portadores nasales) [Jarraud et al., 2001; Becker et al., 2003; Mempel et al., 2003]). En nuestro estudio, los cinco genes de *egc* (por nosotros denominado *egc1*) fueron encontrados, además, en las cepas prototipo de SEB; y SED y la variante *egc2* (*seu*-positiva) en las cepas prototipo de SEC, TSST-1 y ETB2 así como en la cepa control negativo de PTSAg CECT59. Por el contrario, en un estudio de publicación reciente [Becker et al., 2004] sobre la primera investigación sistemática de los genes *sem*, *sen*, y *seo*, en 429a. clínicos bien caracterizados, se ha demostrado la existencia de variabilidad en la composición genómica *egc*. La posesión de *sem*, *sen*, y *seo*, no estaba necesariamente interrelacionada, encontrándose una gran variedad de combinaciones entre éstos y otros genes-PTSAg.
- ii) La agrupación *seb-seq-sek*, compatible con la presencia de SaPI3/ μ Sa1 [Yarwood et al., 2002], fue encontrada en sólo 3 de los 6a. nasales SEB-positivos, además de en la cepa prototipo SEB. En los otros 3a. la presencia de SEB/*seb* no fue asociada a otros genes de PTSAGs. Además, previamente habíamos demostrado que la sonda *seb* no hibridaba con ninguno de los fragmentos de los perfiles *SmaI* generados por estos aislamientos. Datos que apoyan la sugerencia, ya apuntada, sobre la localización de *seb* en un elemento genético no descrito.
- iii) En la cepa prototipo SEC y en 10 de los 12a. nasales que incluían SEC/*sec*, se detectó la agrupación *sec-sel-sem* asociable a una isla de tipo SaPI4/ ν Sa3 (*sek* negativa) [Novick 2003; Schmidt y Hensel, 2004; Gill et al., 2005]. Los dos aislamientos restantes carecían de los genes *sel-sem*, pero eran, además, *sea* y *seh* positivos. Estos datos sugieren que *sec* puede estar, también, localizado en un elemento genético no descrito.
- iv) Las cepas prototipo de las toxinas SED y SEA, y los 8a. SED/*sed* positivos (y no otros aislamientos) eran también positivos para *sej* y *ser*. Como ya se ha comentado, estos tres genes estaban localizados tanto en plásmidos clásicos, como en el cromosoma (Artículo 2).
- v) En ninguno de los aislamientos que incluían *tst*, ni en la cepa prototipo-TSST, la presencia de *tst* fue acompañada de la de otros genes-SE con los que va asociado en las islas secuenciadas [Novick 2003; Schmidt y Hensel, 2004; Gill et al., 2005], por lo que nuevamente se piensa que podría estar inserto en un elemento genético desconocido.
- vi) Todos los aislamientos SEA/*sea* positivos y la cepa control-SEA eran negativos para *sek* (y aquellos que no llevaban el agrupamiento *egc*, también eran negativos para *seg*), sin embargo la combinación *sea-seg2-sek2*, ha sido encontrada en el fago Φ Sa3ms [Sumbly y Waldor, 2003; Gill et al. 2005]. Nuevamente se piensa que *sea* podría estar inserto en un profago o elemento genético por identificar.

Obviamente, tanto la inserción del agrupamiento plasmídico (*sed-sej-ser*) en el cromosoma como la de los otros genes (*tst*, *seb*, *sec*, *sea*) de forma individual, en islotes, islas de patogenicidad o profagos específicos requiere de investigación adicional.

IV.3.3. ¿Cuales son los tipos genómicos y las relaciones con genotipos-T en aislamientos de *S. aureus* productores y no productores de PTSAg “clásicas”? Tras realizar un análisis de macrorrestricción con *SmaI* a los 86a. nasales y las 10 cepas prototipo (Artículo 4), y teniendo en cuenta únicamente las bandas entre ca. 25-kb y ca. 800-kb, se pudo constatar, nuevamente, una alta heterogeneidad en los perfiles obtenidos. De esta forma se obtuvieron 40 perfiles-*SmaI*, con un *ID*=0.96 para los 86a. nasales o de *ID*=0.97 incluyendo a las 10 cepas prototipo (n=96), que fueron agrupados en 9 linajes (L1-L9) más 11 perfiles no agrupables. Mediante el análisis de grupos utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard se trazó el correspondiente dendograma (Artículo 4, Figura 2) y los perfiles-*SmaI* con similitud $\geq 70\%$ fueron considerados genéticamente cercanos y miembros de un mismo linaje. Como queda también reflejado en el dendograma construido. Los aislamientos que contenían genes-SE “nuevos” dieron lugar a 31 perfiles-*SmaI*, asociables a 8 linajes.

Por otro lado, se observaron varias relaciones entre los linajes-*SmaI* y los genotipos-T:

- L1, incluía aislamientos con genotipos en posesión de *tst* (\pm *egc2*, o \pm *sea-egc2*).
- L2 y L3, con genotipos-T que contenían *sea* \pm otros genes-SE.
- L5 con genotipos *seb-sek-seq*.
- L4, L6 y L7 con genotipos que contenían *egc1* y en ocasiones otros genes: *seb* en L4, *sec-sel-sem* \pm *sed-sej-ser* en L6, o sólo *sed-sej-ser* en L7. Ya se ha comentado que mediante técnicas de hibridación de plásmidos se había podido confirmar que la agrupación *sed-sej-ser* estaba insertada tanto en plásmidos como en el cromosoma (Apartado 1.3).

Es de hacer notar la gran cantidad de genes-PTSAg que son mantenidos conjuntamente en muchos de los aislamientos nasales de portadores sanos, un hecho, aún no claramente comprendido, que sugiere la existencia de una relación sinérgica bacteria-hospedador. Respecto a este comentario se ha emitido la hipótesis de que la presencia de este tipo de agrupamientos de genes confiere una ventaja selectiva para la colonización y/o invasión en humanos [Jarraud et al., 2001; Peacock et al., 2002]. También se ha indicado que podría jugar un papel muy importante a la hora de modular la respuesta inmune del hospedador, siendo así capaz de establecer una actividad antitumoral de larga duración y de reforzar la producción de anticuerpos [Torres et al., 2001; Alouf et al., 2003;]. Por otra parte, datos experimentales han demostrado que las toxinas codificadas por *egc* son neutralizadas por el suero humano mucho menos eficientemente que las PTSAg clásicas, y que tanto las cantidades como el espectro de las PTSAg difieren entre aislamientos faríngeos de portadores asintomáticos y de aislamientos de sangre de enfermos con infección sistémica [Holtfreter et al., 2004].

No se debe de obviar que si los *S. aureus* con PTSAGs pasan de la mucosa nasal (o la piel) al medio interno habría un efecto negativo de las PTSAG para el hospedador, debido a su acción tóxica y superantigénica. Estas dos funciones residen en dominios separados y por ello pudieran tener distintas dianas. En teoría, los aislamientos en posesión de múltiples genes-PTSAG deberían tener un gran potencial para originar toxinosis, junto con una remarcada capacidad para la estimulación policlonal de células T y su proliferación, y por tanto inducir varios efectos perjudiciales para el hospedador [Dinges et al., 2000; Jarraud et al., 2001, Torres et al., 2001].

IV.3.4. ¿Qué tipos de *S. aureus* podrían ser considerados frecuentes y/o endémicos en portadores sanos de Asturias, utilizando como marcadores el genotipo-T y el perfil de macrorrestricción genómica? Los datos resultantes de la aplicación de dos métodos de tipificación microbiológicos (perfil de genes de PTSAg o genotipo-T y macrorrestricción genómica con *SmaI* que genera tipos agrupables en linajes) como marcadores epidemiológicos de *S. aureus*, apoyan y amplían las observaciones discutidas en el apartado III.1.4. En dicho apartado se indicaban los linajes toxigénicos de *S. aureus* que podrían considerarse endémicos en Asturias, debido a que se habían encontrado como colonizadores de la mucosa nasal de personas sanas que vivían en la región entre 1996-2002 y en alimentos manipulados. Al adicionar los datos de aislamientos con genes-SE “nuevos”, los linajes que podrían considerarse prevalentes y endémicos en Asturias incluirían, al menos los que se recogen en la Tabla 4.

Recordar que cepas del tipo [*sea*/L2] se aislaron, también, de alimentos implicados en un brote comunitario (en un restaurante, B3 en 2002), cepas [*sec-sel* + *egc1*/L6] en alimentos implicados en otros dos brotes (B1, brote en un segundo restaurante en 2002; y brote familiar en 1998) y cepas [*egc1*/L6], en alimentos implicados en otro brote (B3 en un restaurante en 2002), (Apartado III.2.1).

Tabla 4. Linajes de *S. aureus* prevalentes y/o endémicos en portadores nasales de Asturias

Artículo 2	Artículo 4	Frecuencia	Periodo
Perfil toxinas/Linaje <i>SmaI</i>	Perfil genes de toxinas/ Linaje <i>SmaI</i>	(n=86)	
[TSST-1 ± TSST-1/SEA] / L1, L2 ^a	[<i>tst</i> ± <i>egc2</i> ± <i>sea</i>] / L1	22,1%	1997-2002
[SEA ± SEC] / L3 ^b	[<i>sea</i> ± <i>sea-se±h</i>] / L2	4,7%	1999-2002
[SEB] / L4	[<i>egc1</i> ± <i>seb</i>] / L4	7,0%	1996-2002
[SEC ± SEC/SED]/L6	[<i>egc1</i> ± <i>sec-sel</i> ± <i>sed-sej-ser</i>] /L6	17,4%	1997-2002
[SED]/ L7	[<i>egc1</i> ± <i>sed-sej-ser</i>] /L7	14,0%	1997-2002
Negativo/no analizado	Negativo / L9	14,0%	1996-2002

^{a, b} en el presente apartado quedan englobados en L1 y L2, respectivamente

IV.4. OBJETIVO 4. Determinar los genotipos de exotoxinas en aislamientos de *S. aureus* asociados con mastitis subclínica en vacas y establecer relaciones entre genotipos de virulencia y tipos genómicos. Trazar relaciones entre aislamientos de origen humano y bovino. (Artículos 5 y 6)

Ya se ha indicado que *S. aureus* es una bacteria con potencial para causar infecciones intramamarias (mastitis) en rumiantes. Al menos dos grupos de exotoxinas -leucotoxinas y PTSAGs- intervienen en la iniciación y/o en la exacerbación de la mastitis [Ferens et al., 1998; Rainard et al., 2003; Schubert et al., 2001]. Aunque los PTSAGs no son tóxicos para los neutrófilos o los monocitos, estudios *in vitro* han demostrado que diferentes PTSAGs son capaces de acelerar de forma selectiva la muerte de los neutrófilos bovinos y humanos en presencia de monocitos de la sangre [Schubert et al., 2001]. Además, como *S. aureus* es capaz de colonizar la leche (y productos derivados) si posee un genotipo toxigénico podría producir y excretar toxinas a la leche, entre ellas SEs. Las SEs, al ser termoestables pueden resistir tratamientos de pasteurización, y cuando la leche o productos lácteos con SEs son ingeridos pueden causar intoxicación en el hombre [Mossell et al., 2002; Asao et al., 2003; Le Loir et al., 2003]. En los Artículos 1 y 2 de esta Tesis se constata la presencia de *S. aureus* enterotoxigénicos en productos lácteos como quesos, nata, helados y pastelería, y en el Artículo 3, se

demuestra la presencia de diferentes cepas de *S. aureus* en pasteles-tartas de crema asociados a los tres brotes de intoxicación alimentaria estudiados.

Cuando nos planteamos el presente punto de trabajo, mayo-2003, en Asturias no existía ninguna información sobre los fenotipos-genotipos toxigénicos de *S. aureus* de origen bovino. Por otro lado, en el ámbito nacional o mundial existía una información limitada sobre la prevalencia de las toxinas/genes de reciente descripción en leche de vacas sanas o con mastitis (clínica o subclínica). Dado que Asturias es una región lechera, estudios sobre los peligros sanitarios de la leche y productos lácteos son de alto interés. Por ello, nos planteamos aplicar las técnicas y el conocimiento generado en los objetivos previos al presente objetivo.

Para abordar este apartado contactamos con el Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias (LILA) con la intención de pedirles aislamientos de *S. aureus* de leche de vacas sanas y/o con mastitis subclínica. Sólo pudieron proporcionarnos aislamientos del segundo grupo, recogidos en diferentes análisis, de diferentes ganaderías, y realizados durante marzo 2003-febrero 2004.

Los sub-objetivos de este apartado fueron similares a los del estudio que estábamos realizando con cepas de portadores humanos, salvo que en este caso no se rastrearon genes-ET y se incluyó el rastreo de genes de cinco tipos de hemolisinas, los resultados mas sobresalientes se discuten a continuación.

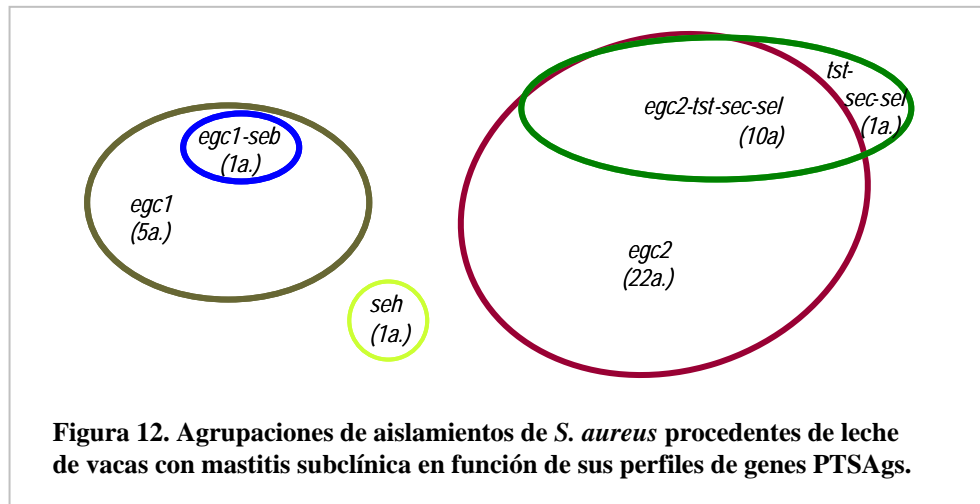
IV.4.1 ¿Cuál es la frecuencia de genes codificadores de exotoxinas en aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de vacas con mastitis subclínica? En total se analizaron 84a. de muestras de leche de 84 vacas diagnosticadas de mastitis subclínica y 6 cepas control mediante el rastreo de secuencias de 27 genes que implicados en la codificación de cinco hemolisinas (*hla*, *hly*, *hld*, *hlg* y *hlg-2*), tres leucotoxinas (*luk-PV*, *lukM* y *lukED*), la toxina del shock tóxico (*tst*) y 18 enterotoxinas (*sea-see*, *seg-ser* y *seu*) por PCR simple y múltiple. Los resultados serán discutidos en base a la relevancia de la presencia de muchos y diferentes genes en la patogénesis de la mastitis bovina y de la seguridad alimentaria.

Es de destacar que todos los aislamientos llevaban tres o cuatro genes de hemolisinas (*hla*, *hlg2* ± *hly* ± *hld*), todos menos uno eran *lukED* positivos, la mitad *lukM* positivos y todos negativos para *lukPV*. Estos datos están en relación con los publicados por Rainard et al. (2003), donde los aislamientos de *S. aureus* relacionados con mastitis eran poseedores de los genes que codifican γ -hemolisina y LukE-LukD. Además, estos autores demuestran la alta actividad de la leucotoxina LukM-LukF-PV` contra PMN en rumiantes; y constatan que los genes de esta leucotoxina se encontraban en el 90% de los casos acompañados de algún gen PTSAg. Sin embargo, tanto las frecuencias reportadas por Rainard et al., (2003) como las encontradas en esta Tesis difieren con lo publicado por Schuberth et al., (2001) quienes utilizando un procedimiento diferente (detección de toxinas mediante citometría de flujo) encuentran frecuencias del 55,2% y el 41% de aislamientos asociados a mastitis clínica y subclínica, respectivamente, producían leucotoxinas.

Con respecto a la frecuencia de genes-PTSAg encontrada en nuestro estudio es destacable que los 84a. fueron *sea*, *sed*, *see*, *sej*, *sep*, *seq* y *ser* negativos; sólo un aislamiento era *seb* positivo y otro *seh* positivo. Los demás genes rastreados aparecían distribuidos en tres clusters: [*tst*, *sec*, *sel*], *egc-1*, y *egc-2*, con una frecuencia de 13,1%; 7,1%; y 38,1%, respectivamente.

Es también relevante la presencia de 9 genes que codifican dos toxinas clásicas (TSST-1 y SEC) y siete “nuevas y putativas” (SEL, SEG, SEI, SEM, SEN, SEO y SEU) en un 11,9% de los

aislamientos. Así como, la presencia de los 5-6 genes que forman *egc*_{like} en un 42,9% de los aislamientos (en una tercera parte junto a *tst-sec-sel*). Las combinaciones encontradas entre los diferentes genes-PTSAG se recogen en la Figura 12.



Nuestros datos sobre la incidencia de PTSAG “clásicas” en aislamientos procedentes de vacas con mastitis subclínica (SEB o TSST-1 y SEC) mostraban concordancia con la incidencia recogida en otros países como Irlanda, USA, y Japón [Nagase et al., 2002 ; Fitzgerald et al., 2000]. Pero a su vez, estos datos diferían con lo también publicado en estudios en Italia [Cenci-Goga et al., 2003] y Korea [Lim et al., 2004] donde SED o SEA eran las PTSAG clásicas más frecuentes, respectivamente; ó en Brasil [Cardoso et al., 1999] donde TSST y/o SED eran las toxinas predominantes y sólo el 3.2% de los aislamientos era productor de TSST-SEC; mientras que un 65% presentaba una o más toxinas. Es reseñable en estudio realizado en Dinamarca en el que sólo encontraron un aislamiento SEC-TSST entre los 414a. analizados de leche de vaca con mastitis [Larsen et al., 2000].

Atendiendo a la fracción de de *S. aureus* con genes de toxinas “nuevas”, en esta Tesis se encontraron tres veces más positivos para ellos que para genes de toxinas “clásicas”. Dato acorde con los publicados por otros autores en aislamientos del mismo origen [Akineden et al., 2001], o de otros orígenes [Jarraud et al., 2001; Rosec y Gigaud, 2002; Omoe et al., 2003; Peacock et al., 2002; Becker et al., 2002]. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que la posesión de PTSAG es útil para la bacteria a la hora de inhibir la respuesta inmune del hospedador. Ya se ha comentado que en las enterotoxinas codificadas por el agrupamiento *egc* (45,2% de los aislamientos frente a 15,5% con otros genes, en este estudio) son neutralizadas por el suero humano menos eficientemente que las enterotoxinas clásicas o la TSST [Holtfreter et al., 2004]. Por otro lado, en nuestro estudio no se pudo constatar una relación directa entre el número ó tipo de genes-PTSAG y una mayor severidad en la patología.

De acuerdo con lo expuesto, los *S. aureus* bajo estudio estaban relacionados con mastitis subclínica pero no se puede descartar que fuesen sólo miembros de la microbiota normal de las vacas. En cualquiera de ambos casos, debido a la posesión de múltiples genes de virulencia, en diferentes combinaciones, todos tienen un fuerte potencial para causar infección mas severa a sus hospedadores (mastitis clínica y diferentes enfermedades tanto a nivel de piel y mucosas, como sistémicas). Por otro lado, su presencia en leche puede representar un serio problema de seguridad

alimentaria, si la leche contaminada con SEs (frecuentemente con apariencia normal) llega a la cadena alimentaria humana directamente o a través de productos lácteos. Brotes de intoxicación causados por leche contaminada con SEs no son raros [<http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threpintro.htm>], y debido a su extensión (13.420 casos) se puede destacar uno registrado en Japón en el año 2000 [Asao et al., 2003].

IV.4.2 ¿Cuales son los perfiles de genes de exotoxinas en *S. aureus* asociados a mastitis subclínica? En este trabajo se encontró que 42a. (45,2%) de *S. aureus* asociados a mastitis subclínica eran portadores de los cinco genes de enterotoxinas que constituyen *egc*, de los cuales 32a. (84,2%) eran, además, *seu*-positivos (variante *egc2*). Esta frecuencia de la variante *egc2* es mucho mayor que la reportada (16,6%) en el estudio en el que se describe la existencia de *seu* como parte de *egc* [Letertre et al., 2003]. Esta discordancia en la frecuencia de *seu*, al igual que otras diferencias en la frecuencia de genes de leucotoxinas y PTSAg en diferentes estudios [Schubert et al., 2001; Rainard et al., 2003; Cenci-Goga et al., 2003], no resulta inesperado debido a múltiples factores:

- La asociación de estos tipos de genes a elementos móviles y por tanto variables (islas genómicas, plásmidos o fagos).
- Cepas distintas podrían haber ganado y estar mantenido a través del tiempo un número variable de estos elementos genéticos móviles.
- La ganadería de distintas áreas geográficas podría haber sido infectada por cepas con distintos genotipos de virulencia.
- Pudiera ser que sólo ante determinadas condiciones, todas o algunas de estas cepas, sean capaces de invadir la piel y mucosas causando la enfermedad o daños en el hospedador. En nuestro conocimiento, no se han realizado o publicado estudios incluyendo el rastreo del gen *seu*, ni de su inserción en PAIs, plásmidos o profagos.

Respecto de la segunda agrupación génica encontrada en este apartado de la Tesis [*tst-sec-sel*], representada por el 13.1% de los aislamientos, se pueden hacer las siguientes observaciones. Es una agrupación inicialmente descrita como parte de SaPIbov en *S. aureus* de origen bovino [Fitzgerald et al., 2001], y posteriormente adscrita a la familia vSa2 [Schmidt y Hensel, 2004; Gill et al., 2005]. Sin embargo, esta asociación de genes está también presente en otras islas (SaPI_{n1}, SaPI_{m1}, SaPI₂) pertenecientes a la familia vSa4 tipoI identificadas en el genoma de aislamientos humanos SAMR [Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002; Gill et al., 2005].

Por otro lado, la secuenciación del genoma completo de *S. aureus* NCTC 8325 (cepa utilizada como control negativo de PTSAg y de perfil de bandas en los análisis de macrorrestricción-PFGE en este estudio) y de aislamientos humanos SAMR [Kuroda et al., 2001; Baba et al., 2002; Gill et al., 2005] ha revelado la presencia de los dos genes de la leucotoxina Luke-LukD en PAIs del grupo de las “serin proteasas”, vSaβ tipos I y II, que coexisten en algunas cepas. La primera de ellas (vSaβ tipo I) contiene el cluster *egc* (Apartado 1.2.1, Figura 5b). Datos obtenidos en nuestro estudio apoyan la presencia de ambas islas, o sólo de vSaβ-tipoI, en el 45,2% de los aislamientos de origen bovino. Es destacable que la mayoría de estos aislamientos (32 de 38) era *seu*-positiva, un hecho que sugiere la existencia de una variante de vSaβ conteniendo *egc2*, o de este agrupamiento en otro tipo de PAI o elemento genético. También es destacable, la existencia de *lukED* en todos menos uno de los aislamientos PTSAg-negativos, esta observación sugiere la presencia de una isla vSaβ-tipoII, o de una PAI no descrita.

IV.4.3 ¿Cuales son los tipos y linajes de *S. aureus* asociados a mastitis subclínica en Asturias? El análisis de macrorrestricción-PFGE con la endonucleasa *SmaI* de los 84a. de mastitis subclínica permitió su adscripción a 39 perfiles genómicos (perfiles *SmaI* ó S). Los 44a. conteniendo

genes-PTSAg generaron 16 perfiles *SmaI*, de los que sólo uno (S92) era también compartido por un aislamiento PTSAg-negativo.

La aplicación del coeficiente de Jaccard y el análisis de clusters mostró la existencia de una amplia heterogeneidad entre perfiles *SmaI* ($S=0,94-0,21$), y la agrupación de la mayor parte de ellos en 7 clusters o linajes (C1-C7). El dato más destacable es que cinco perfiles formaban un cluster (C2; $S \geq 0,80$) que incluía 32a. (38.1%) positivos para los cinco genes *egc1* y *lukED*. Presumiblemente, estos aislamientos podrían llevar vSa β -tipo I \pm vSa β -tipoII. Todos ellos eran, además, positivos para genes (*hla*, *hlb*, *hld* y *hlg2*) de cuatro hemolisinas, y 10 de ellos para tres genes (*tst-sec-sel*) representativos de SaPIbov.

Es de hacer notar que un porcentaje importante ($> 46\%$) de los *S. aureus* asociados a mastitis bovina, potencialmente son muy virulentos debido a que pueden producir un amplio arsenal de toxinas unas citolíticas y otras superantígenos, dado que son portadores de sus genes. Este arsenal abarca tres o cuatro hemolisinas, una o dos leucotoxinas y entre cinco y nueve enterotoxinas (y el 13 %, además, eran productores de TSST). Por otro lado, si se presta atención a que más de la mitad (52,4%) de los aislamientos eran negativos para todos los genes-PTSAg rastreados cabe pensar que sus productos no son clave para el proceso infeccioso subclínico o severo en las glándulas mamarias vacunas, aunque en alguna forma podrían potenciarlo [Dinges et al., 2000; Torres et al., 2001; Schubert et al., 2001; Rainard et al., 2003].

De acuerdo con estos resultados una amplia variedad de tipos genómicos de *S. aureus* toxigénicos, con el predominio de un linaje bien caracterizado, podrían ser parte de la microbiota normal de las vacas y a su vez estar relacionados con casos de mastitis subclínica bovina en Asturias.

La mastitis, tanto clínica como subclínica por *S. aureus*, además de ser un problema en ganadería, genera importantes pérdidas en el sector lácteo de la región, pues como ya se ha indicado es un factor de riesgo de intoxicación alimentaria humana. Sin embargo, la comparación de datos (producción de toxinas clásicas y perfiles *SmaI*) de *S. aureus* aislados de leche de vaca con mastitis subclínica y de alimentos lácteos destinados a consumo humano (Artículos 1, 2 y 3) no reveló la presencia de organismos con idénticas características en ambos grupos. Esta observación debe de ser mirada con precaución dado que el grupo de *S. aureus* procedente de alimentos (excepto los aislamientos asociados a brotes de intoxicación) no fue analizado para genes de SE-nuevas y el perfil-*SmaI* sólo fue estudiado en los aislamientos toxigénicos.

Del estudio conjunto de los resultados obtenidos en la tipificación junto a la posible asociación de genes-PTSAg y leucotoxinas dentro de vSa β -tipo I, y de estos últimos con vSa β -tipoII se podrían avalar los siguientes hechos o aseveraciones:

- Una transmisión horizontal de PAIs entre cepas de distintos orígenes. Aislamientos de mastitis subclínica generando perfiles *SmaI* muy diferentes ($S=0,2-0,9$) poseían siete u ocho genes asociados con islas vSa β . También es de resaltar que los agrupamientos *egc*_{like} han sido identificados en una alta proporción de aislamientos humanos, tanto de productores como no productores de PTSAg clásicas (Apartado III.3.1); sin embargo ninguno de estos aislamientos generó un perfil de genes-PTSAg propio de SaPIbov.
- La formación de clusters con genes de leucotoxinas y superantígenos puede ser beneficiosa para *S. aureus* a la hora de colonizar y/o invadir tejidos u órganos de origen animal (las glándulas mamarias en este caso), además, de tener un papel en la enfermedad. Este mismo fenómeno es esperable respecto de la inserción de varias PAIs en el genoma de una misma cepa.

- Teóricamente la acumulación de varios genes-SE en una misma cepa podría estar relacionado con la cantidad de toxina secretada en el alimento (la leche en este caso) y por lo tanto con la severidad de la intoxicación, si esa leche entrase en la cadena alimentaria, humana o animal.
- Finalmente, debido a la alta frecuencia encontrada del agrupamiento *egc_{like}*, se hace necesario que en estudios de epidemiología molecular sobre PTSAg en cepas de diferentes orígenes e implicadas en diferentes cuadros clínicos (incluidos aquellos con síntomas de toxemia), así como en el diagnóstico de futuros casos de intoxicación alimentaria estafilocócica, se rastree el mayor número posible de SEs, o sus genes, incluyendo siempre los genes asociados a *egc_{like}*. Ante esta perspectiva, el uso de la PCR-múltiple como alternativa a la PCR simple, nos parece una solución simple y precisa, además de rápida y económica.

IV.4.4. Identificación de posibles relaciones genéticas entre aislamientos de *S. aureus* de origen humano y bovino en posesión del agrupamiento de genes de enterotoxinas *egc_{like}*.

Para abordar este apartado se seleccionaron todos los aislamientos, tanto de origen humano como bovino, que habían sido categorizados como *egc*-positivos en apartados previos. Para completar el perfil de genes de toxinas en ambos grupos, los 58a. humanos (H), procedentes de muestras nasales de portadores sanos, se analizaron para la presencia de secuencias de genes (*lukPV*, *lukM* y *lukED*) de tres leucotoxinas; y los 38a. bovinos (B), de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica, para presencia de genes de tres toxinas exfoliativas (*eta*, *etb* y *etd*), en ambos casos por PCR-múltiple. La combinación de resultados demostró que todos los aislamientos eran negativos para *eta*, *etb*, *see*, *sek*, *sep* y *seq*. Además, todos los aislamientos humanos eran también negativos para *etd*, *lukM*, y todos excepto uno también para *lukPV*; mientras que todos los aislamientos bovinos eran negativos para *sea*, *sed*, *sej*, *seh*, y *ser*, y todos excepto uno también para *seb* y *etd*. Otros genes de toxinas aparecieron con diferente frecuencia y agrupadas en diferentes genotipos-T: los aislamientos humanos generaron 15 genotipos-T, los bovinos 5; y ambos grupos otro genotipo-T (TG1b: *seg-sei-sem-sen-seo*, *lukED*, representado por 3a. humanos y 1a. bovino).

Al igual que en los apartados anteriores los genotipos-T fueron usados como marcadores de los elementos genéticos en los que los genes de toxinas podrían estar insertados. Además de *lukED* con vSa β -tipo II y/o *egc_{like}* y *lukED* con vSa β -tipo I (23a. H y los 38a. B), otro elemento portando *egc_{like}* pero no *lukED* parece estar presente en el grupo procedente de portadores nasales humanos. Esta presunción parte del hecho de que un 58.6% de los aislamientos humanos eran *lukED*-negativos.

Otras agrupaciones de genes-PTSAg asociables a elementos genéticos específicos y presentes sólo en uno de los grupos, humano o bovino, fueron los ya comentados: *sec-sel-sem* con SaPI4 (10a. H), *sed-sej-ser* con plásmidos (5a. H); y *sec-sel-tst* con SaPIbov (10a. B). Por el contrario, aunque la presencia de *sea* (11a. H) se debería asociar con un profago (siendo Φ Sa3 el mejor descrito), en ninguno de los aislamientos este gen se encontró junto a *sep-seg2-sek2*, con los que coincide en Φ Sa3 en los genomas de tres cepas humanas resistentes a meticilina [Gill et al., 2005], o *seg2-sek2* en Φ Sa3ms en una cuarta cepa, hipervirulenta y sensible a meticilina [Sumbly y Waldor, 2003].

Se podría recordar que el gen *tst*, presente en 18a. humanos, no se detectó en ningún caso junto a *sek* y *sel'/seq* genes, genes junto a los que forma la isla SaPI1 [Novick et al., 2003, Schmidt y Hensel, 2004]; y que el gen *seb* (3a. H y sólo 1a. B), parece que va en un elemento diferente de la isla SaPI3, dado que los cuatro aislamientos eran *seq-sek* negativos [Yarwood et al., 2002].

Probablemente, el hecho más destacable desde el punto de vista del diferente potencial patogénico de los dos grupos de aislamientos, humano y bovino, tenga su base en la producción de leucotoxinas. Mientras todos los aislamientos de bóvidos eran *lukED*-positivos y el 86,8% *lukM* positivos; todos los aislamientos humanos eran *lukM*-negativos, solamente un 39,7% era *lukED*-positivo y un sólo aislamiento era *lukPV*-positivo. Estas diferencias en la frecuencia y tipos de genes de leucotoxinas en aislamientos de portadores asintomáticos humanos, y de vacas con mastitis subclínica pueden estar en relación con el papel meramente colonizador de los primeros y patogénico de los segundos. Ya ha sido comentado el trabajo en el que se demuestra el papel que desempeñan las leucotoxinas y en especial LukE-LukD en la exacerbación de la mastitis bovina [Rainard et al., 2003].

El análisis de los perfiles *SmaI* demostró una baja similitud (< 25%) entre los aislamientos analizados de ambas agrupaciones. Sólo el perfil generado por un aislamiento bovino fue agrupado junto a dos perfiles de aislamientos humanos en un cluster o linaje. Estos 4a. tienen en común el ser (*egc1*, *seb*, *lukED*)-positivos pero el de origen bovino era además *etd*-positivo. No se puede descartar que la presencia de este último en la leche se debiese a una contaminación a partir del hombre durante alguna actividad manual en el procesado de la misma.

Incluso teniendo en cuenta el tamaño de ambos grupos (58a. H vs. 38a. B), la diversidad de genotipos-T y perfiles-*SmaI* resultó proporcionalmente mucho mayor en el grupo de origen humano que en el de origen bovino (15 y 27 vs. 5 y 12). También se encontró una mayor incidencia de aislamientos positivos o con toxinas clásicas en el grupo humano que en el bovino (32 vs. 11, y 5 vs. 3, respectivamente), y de diferentes perfiles en cada grupo (TSST, TSST-SEA, SEC, SED en el humano vs TST-SEC en el bovino). Por otro lado, es destacable la diferente relación de SEC con otros genes y las dos variantes de *egc* en cada grupo. Así, en el grupo humano los organismos productores de SEC (sóla o en combinación con otras SEs y en ningún caso con TSST) eran positivos para la variante *egc1*; mientras que en el grupo bovino los 10 de los 11 aislamientos productores de SEC (siempre en combinación con TSST) eran positivos para la variante *egc2*, y el aislamiento restante era *egc*-negativo.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los humanos y los bóvidos constituyen reservorios de distintas subpoblaciones de la especie de *S. aureus* en posesión de la agrupación de genes de enterotoxinas *egC*_{like}.

V. CONCLUSIONES

1. La amplificación mediante PCR de secuencias aleatorias (RAPD) y de secuencias de genes de exotoxinas (genotipo-V), así como la macrorrestricción genómica con *SmaI* y el análisis de plásmidos, son métodos de valor probado en la tipificación de *S. aureus*. Estos métodos presentan como mayores inconvenientes, respectivamente, la amplificación de bandas no constantes, la relativa alta frecuencia de falsos negativos, la complejidad-alto coste del equipo, y los fallos en la extracción y detección de formas abiertas o desenrolladas. En la determinación del genotipo-V, la PCR-múltiple se mostró como una alternativa simple, precisa, capaz de economizar y acelerar de forma considerable el rastreo simultáneo de genes frente a la PCR simple.
2. La aplicación de estos métodos, en diferentes combinaciones, permitió hacer estudios de epidemiología molecular dirigidos a conocer los tipos genéticos y toxigénicos más frecuentes en aislamientos de diferentes orígenes recogidos en Asturias (1996-2002): humano (portadores nasales sanos), alimentos elaborados manualmente, y bovino (leche de vacas con mastitis subclínica); así como identificar cepas implicadas en brotes de intoxicación alimentaria.
3. El estudio comparativo de aislamientos de *S. aureus* productores de PTSAGs clásicas, procedentes de portadores sanos y de alimentos manipulados, permitió establecer que constituían un grupo genéticamente heterogéneo, y que existía correlación entre genotipo-T y polimorfismos del ADN. En base a la similitud de los perfiles genómicos *SmaI*, la mayoría de los aislamientos toxigénicos se pudieron agrupar en ocho linajes. Los linajes más frecuentes incluían organismos con [TSST-1 o TSST-1/SEA] y [SEC o SEC/SED], seguidos de linajes con SEA, SEB, o SED. Seis de los ocho linajes agrupaban aislamientos de portadores y de alimentos, y sólo el primero se encontró en una frecuencia mayor (estadísticamente significativa) en humanos. Estos datos apoyan el origen humano de la mayoría de los *S. aureus* en los alimentos analizados, hecho también observado en seis cepas asociadas a cuatro brotes.
4. El análisis de restricción del ADN plasmídico con *HindIII*, *EcoRI*, y *SI*, seguido de hibridación Southern con las sondas *sed*, *sej* y *ser* reveló la existencia de tres tipos de plásmidos que codifican SED. Dos de ellos (pUO-Sa-SED1 y SED2, de 33 y 36 kb, respectivamente, con los genes *sed-sej-ser*) fueron adscritos al tipo "clásico" y el tercero (pUO-Sa-SED3, de 53,5 kb, con los genes *sed*, *sej* y *ser_{like}*) es de nueva descripción. Además, se observó que los plásmidos clásicos (completos, o al menos la región *sed-ser-sej*) aparecían también insertados en el cromosoma. Está es la primera vez que se describe una inserción de plásmidos de enterotoxinas en el cromosoma de *S. aureus*.
5. El rastreo de 14 genes de PTSAGs de reciente descripción y tres genes de leucotoxinas en dos grupos de *S. aureus* procedentes de portadores (productor y no productor de PTSAG "clásicas", 43 aislamientos cada uno), además de aumentar considerablemente la probabilidad de encontrar cepas con PTSAG, puso de manifiesto una mayor diversidad de perfiles *SmaI* en el grupo productor, un claro predominio de aislamientos con el agrupamiento de genes de enterotoxinas *egc* (\pm *seu*) en ambos grupos, y que este tipo de agrupamiento aparecía ampliamente dispersado en linajes de ambos grupos. Todos los aislamientos fueron negativos para los genes de tres enterotoxinas (*see*, *sep*, *seq*), tres exfoliatinas (*eta*, *etb*, *etd*), la leucotoxina *lukM*, y todos excepto uno para la leucotoxina *lukPV*.

6. El rastreo de 26 genes de exotoxinas en 84 aislamientos de leche de vacas con mastitis subclínica mostró que todos ellos eran negativos para *lukPV*, *hlg*, *sea*, *sed*, *see*, *sej*, *sek*, *sep*, *seq* y *ser*; y que porcentajes del 100 portaban algún tipo de genes de hemolisinas, 98,8 de leucotoxinas; 46,4 de enterotoxinas; y 13,1 con la toxina del *shock* tóxico. Los 84 aislamientos se discriminaron en 14 genotipos-T y 39 perfiles-*SmaI*. Es destacable que cinco perfiles-*SmaI* formaban un cluster o linaje que incluía 30 aislamientos con el agrupamiento *egc2*, y 10 de ellos, además con un segundo y característico agrupamiento (*tst-sec-sel*).
7. Determinadas agrupaciones de genes se utilizaron como marcadores de elementos genéticos, y de esta forma se detectaron asociaciones de genes compatibles con PAIs descritas en aislamientos humanos (*seb-sek-seq* con SaPI3; *sec-sel-sem* con SaPI4) y en aislamientos bovinos (*tst-sec-sel* con SaPIbov); y en ambos grupos (*egc_{like}-lukE-lukD* con υ Sa β). Por el contrario, en algunos aislamientos los genes *seb*, *sec*, *tst*, y *egc_{like}* no aparecían en agrupaciones compatibles con las PAIs descritas por lo que podrían estar insertados en elementos genéticos no identificados. Además, en aislamientos humanos se observó una fuerte correlación entre la variante *egc2* (*seu*-positivos) y los genes *tst* \pm *sea*, y la variante *egc1* (*seu*-) y los genes *seb*, *sec* y *sed*.
8. El análisis de las relaciones genéticas entre aislamientos de origen humano y bovino, previamente identificados como *egc_{like}* positivos, trazado mediante macrorrestricción genómica con *SmaI* y perfil de genes de toxinas, mostró mayor diversidad de tipos en aislamientos humanos que en bovinos. Por otro lado es destacable la diferencia en la posesión de genes de leucotoxinas: sólo el 39,7 y 0% de los humanos frente al 98,8 y 50% de los bovinos portaban *lukE-lukD* y *lukM*, respectivamente, hecho que podría estar en relación con el papel meramente colonizador de los primeros y patogénico de los segundos. Los resultados obtenidos sugieren que humanos y bóvidos son reservorios de diferentes subpoblaciones de *S. aureus* portadoras de *egc_{like}*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Atanassova, V., A. Meindl and C. Ring. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham: a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **68**, 105-113, 2001.
- Alouf, J. E. and Müller-Alouf, H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. Med. Microbiol.* **292**, 429-240, 2003.
- Akineden, Ö., C. Annemüller, A.A. Hassan, C. Lämmeler, W. Wolter and M. Zschöck. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 959-964, 2001.
- Asao, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa and S. Kozaki. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* **130**, 33-40, 2003.
- Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto and K. Hiramatsu. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* **359**, 1819-27, 2002.
- Balaban, N. and A. Rasooly. Staphylococcal enterotoxins. *Int J. Food Microbiol.* **61**, 1-10, 2000.
- Barton, B.M., G.P. Harding and A.J. Zuccarelli. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* **226**, 235-240, 1995.
- Bayles, K.W. and J.J. Iandolo. Genetic and molecular analysis of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.* **171**, 4799-4806, 1989.
- Becker K., A.W. Friedrich, G. Lubritz, M. Weilert, G. Peters and C. Von Eiff. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1434-1439, 2003.
- Becker K., W.F. Alexander, P. Georg and C. Von Eiff. Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO and SEIN. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 488-495, 2004.
- Bergdoll M.S., B.A. Crass, R.F. Reiser, N.R. Robbins and J.P. Davis. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with the toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* **1**, **8228**, 1017-1021, 1981.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. Springer-Verlag: New York, 2001.
- Betley, M. J., and J. J. Mekalanos. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* **229**, 185-187, 1985.
- Cardoso, H.F., N. Silva, M.J. Sena and L.S. Carmo. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 347-9, 1999.
- Cenci-Goga, B.T., M. Karama, P.V. Rossitto, R. A. Morgante and J.S. Cullor. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows. *J. Food Prot.* **66**, 1693-1696, 2003.
- Cuevas O., E. Cercenado, A. Vindel, J. Guinea, M. Sánchez-Conde, M. Sánchez-Somolinos, E. Bouza the Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4240-4245, 2004
- Chambers, H. F., and M. Sachdeva. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **161**:1170-1176, 1990.
- Chiou C., H. Wei and L. Yang. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2186-2190, 2000.
- Dinges M.M., P.M. Orwin and M. Schlievert. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 16-34, 2000.
- Daghistani H.I., A.A. Issa and A.A. Shehabi. Frequency of nasal and wound isolates of *Staphylococcus aureus* associated with TSST-1 production in Jordanian population, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 95-98, 2000.
- Fernández-Crehuet, J., A. Pinedo y M. Carnero. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. En *Piédrola Gil. Medicina Preventiva y Salud Pública*. Pags. 481-482. 10^a edición. Masson 2001
- Ferens W.A., W.C. Davis, M.J. Hamilton, Y.H. Park, C.F. Deobald, L. Fox and G. Bohach. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* **66**, 573-580, 1998.

- Fermentas Life Science. Protocol for PCR with Taq DNA Polymerase
<http://www.fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>
- Fitzgerald J.R., P.J. Hartigan, W.J. Meaney and C.J. Smyth. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 1028-1037, 2000.
- Fitzgerald J.R., S.R. Monday, T.J. Foster, G.A. Bohach, P.J. Hartigan, W.J. Meaney and C.J. Smyth. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* **183**, 63-70, 2001.
- Fluit, A.C., C.L.C. Wielders, J. Verhoef., and F.J. Schmitz. Epidemiology and susceptibility of 3051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 University Hospitals participating in the European SENTRY study. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3727-3722, 2001.
- Fueyo J.M., M.C. Mendoza, M.R. Rodicio M.A., González-Hevia y M.C. Martín. Identificación de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* implicadas en tres brotes de intoxicación por alimentos. XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos. Girona, 2004.
- García-Rodríguez J.A. y J.J. Picazo. *Microbiología Médica General*. Género *Staphylococcus*, pags. 79-191, 1996.
- Gill S.R., D.E. Fouts, G.L. Archer, E.F. Mongodin, R.T. DeBoy, J. Ravel, I.T. Paulsen, J.F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, R. Madupu, S.V. Angiuoli, A.S. Durkin, D.H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I.R. Hance, K.E. Nelson and C.M. Fraser. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**, 2426-2438, 2005.
- Gobernado M. *Staphylococcus aureus* resistance. Now vancomycin. *Rev. Esp. Quimioter.* **15**, 211-4, 2002
- Hatakka M., K.J. Björkroth, K. Asplund, N. Mäki-Petäys and H.J. Korkeala. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from hands and nasal cavities of flight-catering employees. *J. Food. Protect.* **11**, 1487-1491, 2000.
- Herruzo Cabrera R., J. García Caballero, F. López Fernández y J. del Rey Calero. Infección hospitalaria: epidemiología y prevención. En *Piédrola Gil. Medicina Preventiva y Salud Pública*. Pags. 579-588. 10ª edición. Masson 2001
- Hiramatsu, K. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol. Immunol.* **39**:531-543, 1995.
- Holtfreter S., K. Bauer, D. Thomas, C. Feig, V. Lorenz, K. Roschack, E. Friebe, K. Selleng, S. Lovenich, T. Greve, A. Greinacher, B. Panzig, S. Engelmann, G. Lina and B.M. Broker. *egc*-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect Immun.* **72**, 4061-71, 2004.
- Jay J.M. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. 1993.
- Jarraud S., C. Mougél, J. Thioulouse, G. Lina, H. Meugnier, F. Forey, X. Nesme, J. Etienne and F. Vandenesch. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* **70**, 631-641, 2002.
- Jarraud, S., M.A. Peyrat, A. Lim., A. Tristan, M. Bes, C. Mougél, J. Etienne, F. Vandenesch, M. Bonneville and G. Lina. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **166**, 669-677, 2001.
- Kaiser G.E. [http://www. BIOL 230 MICROBIOLOGY LABORATORY MANUAL](http://www.BIOL230MICROBIOLOGYLABORATORYMANUAL). Dr. G.E. Kaiser, 2001
- Kuroda M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi and K. Hiramatsu. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **357**, 1225-1240, 2001.
- Larsen H.D., A. Huda, N.H.R. Eriksen and N.E. Jensen. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet. Microbiol.* **76**, 153-162, 2000.
- Le Loir Y., F. Baro and M. Gautier. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen. Mol. Res.* **2**, 63-76, 2003.

- Letertre C., S. Perelle, F. Dilasser and P. Fach.** Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 38-43, 2003.
- Lim S.K., Y. S. Joo, J.S. Moon, A.R. Lee, H.M. Nam, S.H. Wee and H.B. Koh.** Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 581-4, 2004.
- Lina G., G.A. Bohach, S.P. Nair, K. Hiramatsu, E. Jouvin-Marche and R. Mariuzza.** Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* **189**, 2334-6, 2004.
- Lindsay J.A., A. Ruzin, H.F. Ross, N. Kurepina and R. P. Novick.** The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **29**, 527-543, 1998.
- McLauchlin J., G.L. Narayanan, V. Mithani and G. O'Neill.** The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* **63**, 479-488, 2000.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker.** *Brock. Biología de los Microorganismos*. Pearson. 10^a edición. Prentice Hall. Madrid, España, 2003.
- Mandell GL., J. E. Bennett, and R. Dolin (Ed).** *Bennett's -Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed Churchill Livingstone (Philadelphia, Pennsylvania), 2000.
- Martín, M.C., J.M. Fueyo, S.M. Soto, F. Vázquez, y M.C. Mendoza.** Resistencia a antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* procedentes de muestras clínicas, ambiente hospitalario, portadores y alimentos. VI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Quimioterapia. Murcia, 2001.
- Martín M.C., M.A. González-Hevia and M.C. Mendoza.** Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiol.* **20**, 605-610, 2003.
- Mempel M., G. Lina, M. Hojka, C. Schnopp, H.P. Seidl, T. Schafer, J. Ring, F. Vandenesch and D. Abeck.** High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 306-9, 2003.
- Mendoza M.C. and E. Landeras.** Molecular epidemiological methods for differentiation of *Salmonella enteritidis* strains en *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. *Saeed ed.* Iowa State University Press. AMES, 1999.
- Mensa J., J.M. Gatell; M.T. Jiménez de Anta, G. Prats y A. Domínguez-Gil.** *Guía de Terapéutica Antimicrobiana*. Ed. Masson, 2003.
- Miller M.B. and B.L. Bassler.** Quorum sensing in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**, 165-199, 2001.
- Moriñigo M.A.** ¿Qué son los superantígenos?
<http://www.encuentros.uma.es/encuentros44/superantigenos.html>.
- Mossel D.A.A., B. Moreno and C.B. Struijk.** *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia, S.A. España, 2002.
- Murchan S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, R. de Ryck, M. Struelens, C.E. Zinn, V. Fussing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N. El Solh, C. Cuny, W. Witte, P.T. Tassios, N. Legakis, W. van Leeuwen, A. van Belkum. A., Vindel, I. Laconcha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsson-Liljequist, U. Ransjo, G. Coombes and B. Cookson.** Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European Laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1574-1585, 2003.
- Nagase N., A. Shimizu, J. Kawano, K. Yamashita, H. Yoshimura, M. Ishimaru and A. Kojima.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates isolated from bovine mastitis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **64**, 1169-1172, 2002.
- Novick R.P.** Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* **49**, 93-105, 2003.
- Novick R.P., P. Schlievert and A. Ruzin.** Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microb. Infect.* **3**, 585-594, 2001.
- Omoe K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D.L. Hu., D.L. Hu, S. Ueda and K. Shinagawa.** Detection of *seg*, *she*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *she* or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 857-862, 2003.

- Omoe K., D.L. Hu, H. Takahashi-Omoe, A. Nakane and K. Shinagawa.** Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect. Immun.* **71**, 6088-6094, 2003.
- Otto M.** Quorum-sensing control in Staphylococci - a target for antimicrobial drug therapy?. *FEMS Microbiol Lett.* **15**, 135-41, 2004.
- Orwin P.M., D.Y. Leung, H.L. Donahue, R.P. Novick and P.M. Schlievert.** Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* **69**, 360-366, 2001.
- Orwin P.M., D.Y. Leung, T.J. Tripp, G.A. Bohach, C.A. Earhart, D.H. Ohlendorf and P.M. Schlievert.** Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry* **41**, 14033-14040, 2002.
- Orwin P.M., J.R. Fitzgerald, D.Y. Leung, J.A. Gutierrez, G.A. Bohach and P.M. Schlievert.** Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect. Immun.* **71**, 2916-2919, 2003.
- Pascual M.R y V. Calderon V.** *Microbiología Alimentaria*. Ed. Díaz de Santos. 2000.
- Peacock S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill and N.P. Day.** Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**, 4987-96, 2002.
- Rainard P., J.C. Corrales, M.B. Barrio, T. Cochard and B. Poutrel.** Leukotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF^{PV} leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 272-7, 2003.
- Roder B.L., N.H. Eriksen, L.P. Nielsen, T. Slotsbjerg, V.T. Rosdahl and F. Espersen.** No difference in enterotoxin production among *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood compared with strains isolated from healthy carriers. *J. Med. Microbiol.* **42**, 43-47, 1995.
- Rosec J.P., J.P. Guiraud, C. Dalet and N. Richard.** Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 213-221, 1997.
- Rosec J.P. and J.P. Guiraud.** Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 61-70, 2002.
- Sambrook J. and D. Russell.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*. Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2000.
- Sanjay K., S. Srinivas V. Ramaswamy, J. Conradt, M.E. Stemper, R. Reich, K. D. Reed and E.A. Graviss.** Novel Polymorphisms in *mec* genes and a new *mec* complex type in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in rural Wisconsin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3080-3085, 2004.
- Schlievert P.M., L.M. Jablonski, M. Roggiani, I. Sadler, S. Callantine, D.T. Mitchell, D.H. Ohlendorf, and G.A. Bohach.** Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infect. Immun.* **68**, 3630-3634, 2000.
- Schmidt H. and M. Hensel.** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 14-56, 2004.
- Schuberth H.J., C. Krueger, H. Zerbe, E. Bleckmann and W. Leibold.** Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Vet Microbiol.* **20**, 187-99, 2001.
- Soto S.M., B. Guerra, M.A. González-Hevia and M.C. Mendoza.** Potential of randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4830-4836, 1999.
- Struelens M.J., A. Bauernfeind, A. Van Belkum, D. Blanc, B.D. Cookson, L. Dijkshoorn, N. El Solh, J. Etienne, J. Garaizar, P. Gerner-Smith, N. Legakis, H. de Lencastre, M.H. Nicolas, T.L. Pitt, U. Römling, V. Rosdahl and W. Witte.** Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **2**, 2-11, 1996.
- Su Y.C. and A.C.L. Wong.** Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.* **60**, 195-202, 1997.
- Sumby P. and M.K. Waldor.** Transcription of the toxin genes present within the staphylococcal Φ Sa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J. Bacteriol.* **185**, 6841-6851, 2003

- Suzuki Y., M. Saito and N. Ishikawa.** Restriction fragment length polymorphisms analysis by pulsed-field gel electrophoresis for discrimination of *Staphylococcus aureus* isolates from foodborne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 271-274, 1999.
- Tenover F.C., R.D. Arbeit, R. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing and B. Swminathan.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239, 1995.
- Todar K.** Todar's online textbook of Bacteriology, 2005. (www.textbookofbacteriology.net)
- Torres B.A., S. Kominsky, G.Q. Perrin, A.C. Hobeika and H.M. Johnson.** Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp. Biol. Med.* **226**, 164-176, 2001.
- Tsen H-Y., G.K. Yu and I.T. Lin.** Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Food Protect.* **58**, 147-153, 1997.
- Uemura E., S. Kakinohana, N. Higa, C. Toma and N. Nakasone.** Comparative characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from throats and noses of healthy volunteers. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 21-24, 2004.
- Von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H. and Peters G.** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med.* **344**, 11-16, 2001.
- Wei, H. and L. Yang.** Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2186-2190, 2000.
- Wei H.L. and C.S. Chiou.** Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* **128**, 15-20, 2002.
- Williams J.G.K., A.R. Kubelin, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535, 1990.
- Wright J.S., R. Jin and R.P. Novick.** Transient interference with staphylococcal quorum sensing blocks abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 1691-1696, 2005
- Yarwood J.M., J.K. McCormick, M.L. Paustian, P.M. Orwin, V. Kapur and P.M. Schlievert.** Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem.* **277**, 13138-47, 2002.
- Yamaguchi T., K. Nishifuji, M. Sasaki, Y. Fudaba, M. Aepfelbacher, T. Takata, M. Ohara, H. Komatsuzawa, M. Amagai and M. Sugai.** Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infect. Immun.* **70**, 5835-5845, 2002.
- Zhang S., J.J. Iandolo and G.C. Stewart.** The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 227-233, 1998.

VII. ANEXOS

ANEXO 1. Características de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a los tres brotes de intoxicación alimentaria estudiados en el Artículo 3.

Brote	ENTEROTOXINAS/ <i>genes</i>	Soporte genético ^a	GT	Perfil PFGE	Perfil RAPD	Plásmidos		
Muestra (Nº)						Perfil PRP	Cepa	
B1								
Manipulador-1 (2)	- / <i>seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ	GT1	<i>SmaI-1</i>	S7 C1	-	1	
Manipulador-2	- / -		GT0	<i>SmaI-2</i>	S1 C1	1	H1	2
Cordero asado (5)	<i>SECI sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, lukED</i>	SaPI4, vSaβ	GT2	<i>SmaI-3</i>	S4 C3	2	H2	3
Salpicón marisco (5)	<i>SECI sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, lukED</i>	SaPI4, vSaβ	GT2	<i>SmaI-3</i>	S4 C3	2	H2	3
Paella (4)	<i>SECI sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, lukED</i>	SaPI4, vSaβ	GT2	<i>SmaI-3</i>	S4 C3	2	H2	3
Tarta crema (2)	<i>SECI sec, seg, sei, sel, sem, sen, seo, lukED</i>	SaPI4, vSaβ	GT2	<i>SmaI-3</i>	S4 C3	2	H2	3
B2:								
Manipulador-3	- / -		GT0	<i>SmaI-4</i>	S8 C6	3	H3	4
Manipulador 4	<i>SEAI sea, seg, sei, sel, sem, sen, seo, seu, lukED</i>	Profago, vSaβ	GT3	<i>SmaI-5</i>	S7 C1	-	-	5
Manipulador-5	- / <i>seg, seh, sei, sem, sen, seo, seu, lukED</i>	vSaβ, otro ^b	GT4	<i>SmaI-6</i>	S5 C4	-	-	6
Tarta crema	- / <i>seg, seh, sei, sem, sen, seo, seu, lukED</i>	vSaβ	GT4	<i>SmaI-7</i>	S9 C5	4	H4	7
Vegetales ^b (2)	<i>SEAI sea</i>	Profago,	GT5	<i>SmaI-8</i>	S1 C1	5	H5	8
	<i>SECI sec, seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ, otro ^c	GT6	<i>SmaI-9</i>	S1 C1	-	-	9
Solomillo ternera	<i>SECI sec, seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ, otro ^c	GT6	<i>SmaI-9</i>	S1 C1	-	-	9
B3:								
Manipulador-6	<i>SEA sea</i>	Profago	GT5	<i>SmaI-8</i>	S1 C1	5	H5	8
Manipulador-7	- / -		GT0	<i>SmaI-10</i>	S1 C1	6	H6	10
Manipulador-8	<i>SEBI seb, seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ, otro ^d	GT7	<i>SmaI-11</i>	S10 C1	7	H7	11
Manipulador-9	<i>SEAI sea</i>	Profago	GT5	<i>SmaI-8</i>	S1 C1	5	H5	8
Carro centollo	<i>SEAI sea</i>	Profago	GT5	<i>SmaI-8</i>	S1 C1	5	H5	8
Ensalada marisco (2)	- / <i>seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ	GT1	<i>SmaI-12</i>	S1 C1	8	H8	12
	- / <i>seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ	GT1	<i>SmaI-12</i>	S1 C1	9	H9	13
Tarta crema (2)	- / <i>seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ	GT1	<i>SmaI-13</i>	S1 C1	9	H9	14
	- / <i>seg, sei, sem, sen, seo, lukED</i>	vSaβ	GT1	<i>SmaI-13</i>	S1 C1	8	H8	15

^a Todos los aislamientos *lukED*-positivos podrían además llevar vSaα

^{b,c,d} Los genes *seh*, *sec* y *seb*, no se han podido adscribir a soportes genéticos

ANEXO 2.1. Características generales de los aislamientos toxigénicos de *S. aureus* procedentes de alimentos de elaboración manual (Artículos 1 y 2).

Colección-referencia	Toxinas/ genes	RAPD	PFGE- <i>Sma</i> I	PR-plasmidos <i>Hind</i> / <i>Eco</i> RI	Fuente
LSP 91/96	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	C1 E9	Plato prep
LSP 600/96	SEB/ <i>seb</i>	S1 C1	21	B1 E6	Queso
LSP 769/96	SEB/ <i>seb</i>	S1 C1	21	B1 E6	Queso
LSP 1838/97	SEA, SED/ <i>sea-sed</i>	S1 C1	45	D1/H13 E13	Pastel
LSP 1952/97	SEA-TSST/ <i>sea-tst</i>	S1 C4	2	-	Pastel
LSP 2264/97	SEB/ <i>seb</i>	S1 C1	22	B2 E7	Pastel
LSP 3523/97	SEA/ <i>sea</i>	S1 C1	16	A1	Queso
LSP 5836/97	SED/ <i>sed-sej</i>	S1 C1	41	D2/H12 E12 ¹	Pastel
LSP 5840/97	SED/ <i>sed-sej</i>	S1 C1	46	D1/H13 E13 ²	Pastel
LSP 5841/97	SED/ <i>sed-sej</i>	S1 C1	44	D1/H13 E13 ²	Pastel
LSP 5914/97	SEA-TSST/ <i>sea-tst</i>	S1 C4	3b	A3 E2	Pastel
LSP 5919/97	SED/ <i>sed-sej</i>	S1 C1	43	D1/H13 E13 ²	Pastel
LSP 5920/97	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	34	C3 E10	Pastel
LSP 5921/97	SEC/ <i>sec</i>	S1 C1	35	C4	Pastel
LSP 6064/97	TSST-1/ <i>tst</i>	S5 C1	8	-	Pastel
LSP 6512/97	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	35	C4	Pastel
LSP 6513/97	SED/ <i>sed-sej-ser</i>	S1 C1	43	D1/H13 E13 ²	Pastel
LSP 6514/97	SED/ <i>sed-sej-ser</i>	S1 C1	43	D1/H13 E13 ²	Pastel
LSP 6592/97	SED/ <i>sed-sej</i>	S1 C4	41	D2/H12 E12 ¹	Pastel
IPLA 79/98	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	-	Queso
IPLA 87/98	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	-	Queso
IPLA 90/98	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	-	Queso
IPLA 98/98	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	-	Queso
LSP 454/99	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	-	Plato prep.
LSP 2280/99	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	-	Plato prep
LSP 95/99	SEA-TSST/ <i>sea-tst</i>	S1 C1	3a	-	Queso
LSP 947/99	SEA-TSST/ <i>sea-tst</i>	S1 C1	6	-	Nata
LSP 1739/99	SEA/ <i>sea</i>	S1 C1	16	A3 E2	Alimento
LSP 2766/99	TSST-1/ <i>tst</i>	NE	10	-	Plato prep.
LSP 4341/99	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	C1 E9	Plato prep.
LSP 3063/99	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	C1 E9	Tarta crema
LSP 3179/99	SEA-TSST/ <i>sea-tst</i>	S1 C1	3a	-	Helado
LSP b1-4/02	SEC/ <i>sec</i>	S4 C3	31	C1 E9	Diversos
LSP b2-5/02	SEA/ <i>sea</i>	S1 C1	14	A4 E3	verduras.
LSP b2-5/02	SEC/ <i>sec</i>	S1 C1	36	-	Diversos
LSP b3-5/02	SEA/ <i>sea</i>	S6 C1	14	A4 E3	Centollo

¹, Perfiles de restricción correspondientes a pUO-Sa-SED1

², Perfiles de restricción correspondientes a pUO-Sa-SED3

ANEXO 2.2. Características generales de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de muestras nasales de portadores sanos y portadores de genes de PTSAg y/o leucotoxinas (Artículos 1, 2, 4 y 6).

Cepal/año	PTSAg TOXINAS/ <i>genes</i>	Genes Leucotoxina	RAPD	PFGE- <i>Sma</i> I	PR-plasmidos <i>Hind</i> / <i>Eco</i> RI ¹
MUO G5/97	SEA, TSST/ <i>sea, tst</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-	S1 C1	5	-
MUO G6/97	SEB/ <i>seb, seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>	S1 C4	23	B1 E6
MUO G10/97	SEB/ <i>seb, seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>	S1 C1	25	-
MUO 1/98	SEA/ <i>sea, seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>	S1 C1	17	A5 E4
MUO 4/98	SEA, TSST/ <i>sea, tst</i>		S6 C1		
MUO 11/98	SEA/ <i>sea</i>		S7 C1		
MUO 17/98	SEA/ <i>sea</i>		S1 C1		
MUO 30/98	SEA/ <i>sea</i>		S1 C1		
MUO 38/98	SEA, TSST/ <i>sea, tst</i>		S7 C1		
MUO 62/98	TSST/ <i>tst</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	<i>lukED</i>	S7 C1	9	-
MUO 63/98	SEA, TSST/ <i>sea, tst</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-	S7 C1	2	-
MUO 70/98	TSST/ <i>tst</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	<i>lukPV</i>	S6 C1	9	-
MUO 77/98	TSST/ <i>tst</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-	S6 C1	9	-
MUO P15/98	TSST/ <i>tst</i>	-	S1 C1	17	A3 E1
MUO 9/98	SEC, SED/ <i>sec-sel, sed-sej-ser,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	-	S4 O3	31b	C5/H12 E12 ²
MUO 66/98	SEC, SED/ <i>sec-sel, sed-sej-ser,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	-	S4 O3	31b	C5/H12 E12 ²
MUO 71/98	SEC, SED/ <i>sec-sel, sed-sej-ser,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	-	S4 O3	31b	C5/H12 E12 ²
MUO 72/98	SEC, SED/ <i>sec-sel, sed-sej-ser,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>		S4 O3		
MUO 54/98	SEA, SEC/ <i>sea, sec, seh</i>	-	S1 C1	15	A3 E1
MUO P3/99	SEA, TSST/ <i>sea, tst</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-		7	-
MUO P8/99	TSST/ <i>tst</i>	-		13	-
MUO P12/99	SEC/ <i>sec-sel,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	-	S4 C3	32	-
MUO P15/99	SEA, SEC/ <i>sea, sec, seh</i>	<i>lukED</i>		15	A3 E1
MUO 94/99	SEC/ <i>sec</i>	-	S4 C3	31	C1 E9
MUO 95/99	SEA, TSST/ <i>sea, tst,</i> <i>seg-sei-sem-seo-sen-seu</i>	-	S1 C3	3	-
MUO 1/01	SEA, TSST/ <i>sea, tst,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-		40c	-
MUO 2/01	SEA/ <i>sea, tst,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-		3a	-
MUO 3/01	-/ <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>		55	
MUO 4/01	SEC/ <i>sec-sel,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	-		31	C1 E9
MUO 5/01	-/ <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>		51	
MUO 6/01	SEA/ <i>sea, tst,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-		3	-
MUO 7/01	-/ <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>		70	
MUO 8/01	-/ <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>lukED</i>		55b	-

MUO 9/01	SEA/sea, tst, seg-sei-sem, sen-seo-seu	-	3a	-	
MUO 10/01	SEC/sec-sel, seg-sei-sem-sen-seo-seu	-	31	C1	E9
MUO 11/01	seg-sei-sem-sen-seo-seu	lukED	56		
MUO 12/01	seg-sei-sem-sen-seo-seu	lukED	52		
MUO 13/01	seg-sei-sem-sen-seo-seu, seh		62		
MUO 14/01	SEB/seb-sek-seq	-	26	B3	E8
MUO 15/01	-/ seg-sei-sem-sen-seo	-	31		
MUO 16/01	-/ seg-sei-sem-sen-seo	-	31		
MUO 17/01	SEC/sec-sel, seg-sei-sem-sen-seo	-	33	C1	E9
MUO 18/01	-	-	71		
MUO 19/01	-/seg-sei-sem-sen-seo-seu	lukED	57		
MUO 20/01	-	lukED	71		
MUO 21/01	SEB/seb-sek-seq	-	28	-	
MUO 22/01	TSST/tst, seh seg-sei-sem-sen-seo-seu	-	11	-	
MUO 23/01	-	lukED	70		
MUO 24/01	-/seo	lukED	63		
MUO 25/01	-	lukED	72		
MUO 26/01	-/seo	lukED	64		
MUO 27/01	SEC/sec-sel, seg-sei-sem-sen-seo	-	31	C1	E9
MUO 28/01	-	lukED			
MUO 29/01	-	lukED			
MUO 30/01	-/seg-sei-sem-sen-seo	-			
MUO 31/01	TSST/tst, seg-sei-sem-sen-seo-seu	lukED	8	-	
MUO 33/01	-	lukED	73		
MUO 34/01	-/seg-sei-sem-sen-seo	lukED	53		
MUO 35/01	-/seg-sei-sem-sen-seo	lukED	51		
MUO 36/01	-/seg-sei-sem-sen-seo	lukED	54		
MUO 1/02	-	lukED	74		
MUO 2/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	lukED			
MUO 3/02	-	-	75		
MUO 4/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	-	61		
MUO 5/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	-	31		
MUO 6/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	-	31		
MUO 7/02	SED/sed-sej-ser, seg-sei-sem-sen-seo	lukED	42	D1/H13	E13 ³
MUO 8/02	TSST/ tst, seh, seg-sei-sem-sen-seo-seu		11	-	
MUO 9/02	-	lukED			
MUO 10/02	SED/sed-sej-ser, seg-sei-sem-sen-seo	LukED	42	D1/H13	E13 ³
MUO 11/02	-	LukED	74		
MUO 12/02	SEC/sec-sel, seg-sei-sem-sen-seo		31		
MUO 13/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	LukED	58		
MUO 14/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	LukED	72		
MUO 15/02	SEC/sec-sel, seg-sei-sem-sen-seo	-	31	-	
MUO 16/02	-/seg-sei-sem-sen-seo		31		
MUO 17/02	-/seg-sei-sem-sen-seo	LukED	55		

MUO 18/02	SEB/ <i>seb-sek-seq</i>			27	B3	E8
MUO 19/02	SEA, TSST/ <i>sea, tst, seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-		3a	-	
MUO 20/02	SEA/ <i>sea</i>	<i>LukED</i>		18	A6	E5
MUO 21/02	SEA/ <i>sea, tst, seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-		3a	-	
MUO 22/02	-	<i>LukED</i>		70		
MUO 23/02	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>LukED</i>		52		
MUO 24/02	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>LukED</i>		52		
LSP b1-1/02	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>LukED</i>	S7 C1	70	-	
LSP b1-2/02	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>LukED</i>	S7 C1	70	-	
LSP b1-3/02	-	<i>LukED</i>	S1 C1	73	H14-	
LSP b2-1/02	-		S8 C6	75	H15	
LSP b2-2 /02	SEA, TSST/ <i>sea, tst, seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	<i>LukED</i>	S7 C1	3a	-	
LSP b2-3 /02	TSST/ <i>tst, seh, seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	-	S5 C4	11	-	
LSP b3-1/02	SEA/ <i>sea</i>	-	S1 C1	14	A4	E3
LSP b3-2/02	<i>-/seq</i>	<i>LukED</i>	S1 C1	65	H16	
LSP b3-3 /02	SEB/ <i>seb, seg-sei-sem-sen-seo</i>	<i>LukED</i>	S10 C1	24	B1	E6
LSP b3-4 /02	SEA/ <i>sea</i>	<i>LukED</i>	S1 C1	14	A4	E3

El signo – indica negativo; el apartado en blanco indica que no se realizó el ensayo. Todas las cepas de portadores son negativas para *eta*, *etb* y *etd*

¹ El perfil de restricción de plásmidos solamente fue analizado en cepas productoras de enterotoxinas clásicas ensayadas.

² Perfiles de restricción correspondientes a pUO-Sa-SED2.

³ perfiles de restricción correspondientes a pUO-Sa-SED1.

ANEXO 2.3. Características generales de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica. (Artículos 5 y 6).

Cepa	Genes de Hemolisinas ¹	Genes de Leucotoxinas ²	PTSAg TOXINAS/ <i>genes</i> ³	PFGE- <i>Sma</i> I
M1	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S121
M2	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S122
M3	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S103
M4	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S104
M5	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S105
M6	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S82
M7	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S106
M8	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S87
M9	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S81
M10	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S82
M11	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S80
M13	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S103
M14	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S103
M16	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S82
M17	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	SEB/ <i>seb, etd,</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo</i>	S85
M18	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S11
M20	<i>hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S120
M21	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M22	<i>hly</i>	<i>lukED</i>	-	S107
M23	<i>hly</i>	<i>lukED</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S88
M24	<i>hly</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M25	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S81
M26	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S104
M27	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S119
M28	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M29	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S90
M30	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M31	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S108
M32	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S83
M33	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S114
M34	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M35	<i>hly</i>	<i>lukED</i>	-	S106
M36	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S112
M37	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S109
M38	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S103
M39	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M40	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M41	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S103
M42	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S84
M43	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S104
M44	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S101
M45	<i>hly, hld</i>	<i>lukED</i>	-	S92
M46	<i>hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S89
M47	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S89
M48	<i>hly, hld</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S84

M50	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S101
M51	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S102
M52	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M53	<i>h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S121
M54	<i>h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S116
M55	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S104
M56	<i>h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M57	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i>	S86
M58	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M59	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>		S117
M60	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M61	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S115
M62	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S122
M63	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S121
M64	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S110
M65	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S104
M66	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S118
M67	<i>h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S115
M68	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M69	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo</i>	S90
M70	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S83
M71	<i>h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S120
M72	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M73	<i>h1d</i>		-	S124
M74	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S84
M75	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S91
M76	<i>h1b</i>	<i>lukED</i>	-	S106
M77	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S84
M78	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M79	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M80	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S82
M81	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S109
M82	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S113
M83	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	SEC-TSST/ <i>sec-tst-sel</i> <i>seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80b
M84	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	<i>-/seg-sei-sem-sen-seo-seu</i>	S80
M87	<i>h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S123
M89	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S104
M90	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED</i>	-	S104
M92	<i>h1b, h1d</i>	<i>lukED, lukM</i>	-	S115

Todos los aislamientos fueron positivos para los genes *h1a* y *h1g-2*, y negativos para los genes *h1g*, *lukPV*, *sea*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *sek*, *sep*, *seq* y *ser*.

ANEXO 3.1. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la detección de genes de exotoxinas de *S. aureus*

Gen/es diana	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Referencia
<i>sea</i>	<i>se[ade]f</i> AAAGATTTGCGAAAAAAGTGTGAATT <i>sea-r</i> TAAATCGTAATTAACCGAAGGTTCTG	669	Martín et al., 2003
<i>seb</i>	<i>se[bc]f</i> TATGATGATAATCATGTATCAGCAA <i>seb-r</i> CCAAATAGTGACGAGTTAGGTAA	424	Martín et al., 2003
<i>sec</i>	<i>se[bc]f</i> TATGATGATAATCATGTATCAGCAA <i>sec-r</i> TAAGTACATTTTGAAGTTCCCAT	315	Martín et al., 2003
<i>sed</i>	<i>se[ade]f</i> AAAGATTTGCGAAAAAAGTGTGAATT <i>sed-r</i> GAACTTTATCTAAAGAACTTCT	401	Martín et al., 2003
<i>see</i>	<i>se[ade]f</i> AAAGATTTGCGAAAAAAGTGTGAATT <i>see-r</i> TTGCACCTTACCGCCAAAGCTG	512	Martín et al., 2003
<i>seg</i>	SEG1-TGCTATCGACACCTACAACC SEG2-CCAGATTCAAATGCAGAACC	704	McLauchlin et al., 2000
<i>seh</i>	SEH1-CGA AAGCAGAAGATTTACACG SEH2-GACCTTTACTTATTTTCGCTGTC	495	McLauchlin et al., 2000
<i>sei</i>	SEI-3 CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG SEI-4 AAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	576	Jarraud et al., 2001
<i>sej</i>	<i>se[ade]f</i> AAAGATTTGCGAAAAAAGTGTGAATT <i>sej-r</i> ATGCATGTTTTTCAGATTCTATGA	648	Martín et al., 2003
<i>sek</i>	SEK-3 ACCGCTCAAGAGATTGAT SEK-4 TTATATCGTTTTCTTTATAAGAA	278	Yaewood et al., 2002
<i>sel</i>	SEL-1 AATATATAACTAGTGATCTAAAGGG SEL-2 TATGGAATACTACACCCCTTATA	359	Fueyo et al., 2005 Artículo 5
<i>sem</i>	SEM-1 ATGCTGTAGATGTATATGGTCTAAG SEM-2 CGTCCTTATAAGATATTTCTACATC	473	Fueyo et al., 2005 Artículo 5
<i>sen</i>	SEN-1 ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT SEN-2 AACTCTGCTCCCACTGAAC	680	Jarraud et al., 2001
<i>seo</i>	SEO-1 TGTAGTGTAACAATGCATATGCAAATG SEO-2 TTATGTAATAATAAACATCAATATGATGTC	722	Fueyo et al., 2005 Artículo 5
<i>sep</i>	SEP-1 TTAGACAAACCTATTATCATAATGG SEP-2 TATTATCATGTAACGTTACACCGCC	272	Fueyo et al., 2005 Artículo 5
<i>seq</i>	SEQ-1 AAGAGGTAACGTCTCAAG SEQ-2 TTATTCAGTCTTCTCATATG	285	Yaewood et al., 2002
<i>ser</i>	SER-1 AAACCAGATCCAAGGCCTGGAG SER-2 TCACATTTGTAGTCAGGTGAACTT	700	Fueyo et al., 2005 Artículos 2, 6
<i>seu</i>	PSE-2 TAAAATAAATGGCTCTAAAATTGATGG PSE-6 ATCCGCTGAAAAATAGCATTGAT	141	Letertre et al., 2003
<i>tst</i>	TST-1 AGCATCTACAAACGATAATATAAAGG TST-2 CATTGTTATTTTCCAATAACCACCCG	481	Fueyo et al., 2005 Artículo 5
<i>eta</i>	ET-1 CTATTTACTGTAGGAGCTAG ET-2 ATTTATTTGATGCTCTCTAT	741	Yamaguchi et al., 2002
<i>etb</i>	ET-3 ATACACACATTACGGATAAT ET-4 CAAAGTGTCTCCAAAAGTAT	629	Yamaguchi et al., 2002
<i>etd</i>	ET-14 AACTATCATGTATCAAGG ET-15 CAGAATTTCCCGACTCAG	376	Yamaguchi et al., 2002
<i>lukPV</i>	PVL1 ATCATTAGGTAATGTCTGGACATGATCCA NPVL-2 CATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	433	Jarraud et al., 2002
<i>lukED</i>	LUKDE-1 TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG LUKDE-2 TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	269	Jarraud et al., 2002
<i>lukM</i>	LUKM-1 TGGATGTTACCTATGCAACCTAC LUKM-2 GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC	780	Jarraud et al., 2002

<i>hla</i>	HLA-1 CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG HLA-2 CTTCCAGCCTACTTTTTATCAGT	209	Jarraud et al., 2002
<i>hlb</i>	HLB-1 GTGCACTTACTGACAATAGTGC HLB-2-2 GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	Jarraud et al., 2002
<i>hld</i>	HLD-1 AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGAGTG HLD-2 TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA	111	Jarraud et al., 2002
<i>hlg</i>	mpHLG-1 GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA mpHLG-2 CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG	535	Jarraud et al., 2002
<i>Hlg-2</i>	mp-HLG2-1 GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT mp-HLG2-2 ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG	390	Jarraud et al., 2002

ANEXO 3.2. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la amplificación de secuencias aleatorias (RAPD)

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Amplicón pb	Referencia
<i>S</i>	TCACGATGCA	varios	Willians et al., 1990
<i>C</i>	AGGGAACGAG	varios	Soto et al., 1999