



Aplicación de la estrategia One Health al estudio de patógenos emergentes con relevancia en Castilla y León

Aplicación de la estrategia

ONE HEALTH

al estudio de patógenos emergentes con relevancia en Castilla y León

Jaime Ariza Miguel

2015 Jaime Ariza Miguel



TESIS DOCTORAL

Aplicación de la estrategia *One Health* al estudio de patógenos emergentes con relevancia en Castilla y León

Defendida por Jaime Ariza Miguel,
para optar al grado de Doctor por la Universidad de León

Dirigida por
el Dr. David Rodríguez Lázaro, la Dra. Marta Hernández Pérez
y el Dr. Elías F. Rodríguez Ferri

León, noviembre 2015

A mis padres

i	Sinopsis
vii	Abstract
xiii	Listado de abreviaturas
xv	Agradecimientos
3	Capítulo 1. Introducción
39	Capítulo 2. Ámbito de aplicación de esta Tesis
	2.1 Objetivos
	2.2 Esquema de presentación de la memoria de Tesis Doctoral
	Capítulo 3. Resultados
45	3.1 <i>Mycoplasma agalactiae</i>
	3.1.1 A survey of <i>Mycoplasma agalactiae</i> in dairy sheep farms in Spain
	3.1.2 Molecular Characterization of <i>Mycoplasma agalactiae</i> Reveals the Presence of an Endemic Clone in Spain
	3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)
	3.2.1 Molecular epidemiology of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in a university hospital in northwestern Spain
73	3.2.2 Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Harboring <i>mecC</i> in Livestock, Spain
	3.2.3 Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> transmission
	3.2.4 Foods from black market at EU border as a neglected route of potential Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> transmission
	3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>
109	3.3.1 Molecular Epidemiology of Invasive Listeriosis due to <i>Listeria monocytogenes</i> in a Spanish Hospital over a Nine-Year Study Period, 2006-2014
	3.3.2 Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish Airport
	3.4 <i>Francisella tularensis</i>
131	3.4.1 Molecular Investigation of Tularemia Outbreaks in Spain, 1997-2008
147	Capítulo 4. Discusión general
179	Capítulo 5. Conclusiones
185	Capítulo 6. Referencias bibliográficas

"Between animal and human medicine there is no dividing line nor should there be.

The object is different but the experience obtained constitutes the basis of all medicine"

—Rudolf Virchow (1958)

Sinopsis

El concepto “**One Health**” ha resurgido internacionalmente en la última década con el objetivo de abordar la salud y el bienestar desde un marco común. En la actualidad se dan una serie de circunstancias (el aumento exponencial de la población mundial y de la demanda de proteínas de origen animal, la globalización extrema, el transporte y comercio internacionales, entre otras), que actuando de forma sinérgica, hacen que las relaciones entre la salud del hombre, los animales y el medio ambiente sean más estrechas que nunca. Por tanto, la existencia de problemáticas globales requiere de la colaboración inter, multi y transdisciplinar por parte de profesionales, empresas privadas e instituciones gubernamentales con ámbito de trabajo en todas las disciplinas involucradas, con el fin de abordarlas desde un punto de vista integral, que permita el diseño y aplicación de programas de prevención y control eficaces que limiten su impacto.

Englobado en este contexto, el propósito de esta Tesis Doctoral es abordar problemas tanto de Salud Pública y Sanidad Animal, como del sector agroalimentario en Castilla y León, estudiando la prevalencia y principales vías de transmisión de cuatro patógenos emergentes que tienen un importante impacto en la economía de la región: las especies del género *Mycoplasma* involucradas en el síndrome de la agalaxia contagiosa (AC), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Listeria monocytogenes* y *Francisella tularensis*. El estudio de estos patógenos se enmarca dentro de la estrategia *One Health*, ya que o bien constituyen un problema de seguridad alimentaria, causando una disminución en la disponibilidad de proteínas de origen animal (*M. agalactiae* y *S. aureus*), o bien son agentes zoonóticos, contribuyendo además al origen y dispersión de la resistencia a antibióticos (SARM), constituyendo un riesgo para la inocuidad de los alimentos (*L. monocytogenes*) u originando un peligro de exposición al medio ambiente (*F. tularensis*). Los estudios realizados a lo largo de este trabajo doctoral han sido publicados en 9 manuscritos, desarrollados a través de la colaboración interdisciplinar entre nuestro instituto de investigación, el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), y el Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León (LILCyL), la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, el Laboratorio Regional de Sanidad Animal (LRSA), el Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE), el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, el Aeropuerto Internacional de Bilbao y la Facultad de Ciencias de los Alimentos e Ingeniería de Galati (Rumanía).

La metodología utilizada ha complementado los métodos microbiológicos clásicos con técnicas de epidemiología molecular, con el fin de obtener un valor añadido que permita identificar los factores que, dentro del entorno físico y ambiental, afectan al riesgo de padecer una enfermedad determinada, y que son susceptibles de ser sometidos a una intervención preventiva por parte de las autoridades competentes. Así, la detección molecular de los patógenos se ha realizado mediante sistemas de PCR convencional y PCR a tiempo real, y la caracterización genómica de los mismos, mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), análisis multi-locus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA) y tipificación multi-locus de secuencias (MLST).

En primer lugar, se investigó la presencia de las cuatro especies del género *Mycoplasma* causantes del síndrome de la AC y de *S. aureus*, en explotaciones de ganado ovino de aptitud láctea de Castilla y León. Dentro del marco de la estrategia *One Health* estos patógenos tienen relevancia en el contexto de la **seguridad alimentaria**, ya que causan pérdidas importantes en la producción láctea de los rumiantes, siendo unas de sus principales causas de mastitis. La presencia de las cuatro especies de micoplasmas fue estudiada en 597 muestras de leche de los tanques de mezcla de 528 explotaciones, entre julio del 2009 y abril del 2010. *M. agalactiae* fue la única especie observada, por lo que se continuó con su detección hasta en un total de 1.798 muestras de 1.313 explotaciones localizadas en 12 provincias, 8 de ellas de Castilla y León, del 2008 al 2010. Esta especie fue detectada en todas las provincias estudiadas, con una prevalencia tras el enriquecimiento de las muestras del 36,8% mediante PCR a tiempo real, y del 9,2% por observación microscópica tras el cultivo microbiológico. Por otro lado, la caracterización genómica de 410 aislados de *M. agalactiae* mediante PFGE, VNTR y MLST, mostró una gran homogeneidad genética, perteneciendo todos ellos al genotipo st-10 por MLVA, y el 92% de los mismos al ST-5 mediante MLST, lo que nos permite confirmar la presencia de una población endémica clonal en nuestro país. Los resultados obtenidos en nuestros estudios en ganado ovino, contrastan con la situación observada en el ganado caprino, en el que se detectaron las cuatro especies del género *Mycoplasma*, y los aislados de *M. agalactiae* mostraron una diversidad genética elevada. Por tanto, la AC ovina y caprina cursan con una epidemiología diferente en España. A su vez, la presencia de *S. aureus* se estudio en 486 de las explotaciones, mostrando una prevalencia del 68,5%, lo que apunta a que ambos patógenos podrían estar causando grandes pérdidas económicas directas e indirectas en el sector ovino de Castilla y León. Asimismo la elevada prevalencia de *S. aureus* podría tener implicaciones en Salud Pública, ya que frecuentemente porta genes de resistencia a

antibióticos, sin olvidar el aspecto de su poder patogénico vinculado a la producción de enterotoxinas, capaces de producir episodios de intoxicaciones alimentarias, aunque ese último aspecto no haya sido tratado en este trabajo.

En este sentido, la emergencia de **microorganismos con resistencia a antibióticos**, constituye actualmente una de las mayores preocupaciones a nivel mundial, debido a su gran impacto socio-económico y a sus implicaciones en materia de Salud Pública, comprometiendo el tratamiento de enfermedades a medio y largo plazo. Por este motivo, este es uno de los tres puntos prioritarios de la alianza OMS-OIE-FAO dentro de la estrategia *One Health*. En consecuencia, hemos estudiado la presencia de SARM desde una aproximación holística, tanto en el ámbito animal, en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León, como en el clínico, en el CAULE. La presencia de linajes específicos de SARM ha sido demostrada tanto en los animales de producción, como en los productos alimentarios asociados, razón por la que también hemos estudiado el papel de la venta e importación de alimentos de origen animal a la UE desde países extracomunitarios, en la diseminación de SARM.

Los clones ST5 y ST125 (CC5-SARM-IV) fueron los más prevalentes (76,5%) en el CAULE durante los años 2007-2008, lo que está en concordancia con otros estudios llevados a cabo a nivel nacional y confirma la presencia de una población endémica clonal en el entorno clínico español. Por otro lado, detectamos por primera vez en España la presencia de un aislado SARM con el gen homólogo *mecC* en ganado (ovejas), de un total de 601 aislados de *S. aureus* analizados procedentes de 229 explotaciones (0,4%). Este descubrimiento tiene importantes implicaciones en la Salud Pública, ya que los métodos de rutina que se utilizan en los hospitales para el diagnóstico de SARM fallan en la detección de la variante con el gen *mecC*, lo que puede derivar en el tratamiento inadecuado de los pacientes y a la subestimación de la prevalencia de SARM en el ámbito hospitalario. Por otro lado, se detectó la presencia de aislados de SARM de linajes asociados a la comunidad (ST8-SARM-IV) y al ganado (ST398-SARM-IV/V), en las muestras decomisadas en el Aeropuerto Internacional de Bilbao, y en un mercado gris en la frontera de Rumanía con la República de Moldavia, lo que demuestra que la importación y la venta ilegal de alimentos a la UE desde países extracomunitarios constituyen rutas de diseminación de microorganismos con resistencia a antibióticos. Otra observación interesante, es que a pesar de que se detectaron linajes asociados al ganado (ST130-SARM-XI y ST398-SARM-IV/V) en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León, así como la introducción en

España de aislados comunitarios (ST8-SARM-IV) a través de la importación ilegal de alimentos en vuelos extracomunitarios, ninguno de ellos fueron encontrados en el CAULE. Estos resultados, junto con los obtenidos en otros estudios publicados previamente en el entorno hospitalario español, sugieren que a pesar de la emergencia mundial de estos linajes, su presencia por el momento es infrecuente en los hospitales de nuestro país.

Otro aspecto importante en Salud Pública es el concepto de **inocuidad alimentaria**, que implica que los alimentos tienen que ser seguros para la población. Las enfermedades de transmisión alimentaria representan un gran problema tanto económico, como de Salud Pública. De todas las enfermedades zoonóticas investigadas por la UE, la listeriosis es responsable de los casos más graves, con una tasa de hospitalización y mortalidad del 99,1% y 15,6%, respectivamente. Además, se ha observado por quinto año consecutivo una tendencia en el aumento de los casos en la UE-28, del 9,4% en el 2013 con respecto al año anterior. El estudio de *L. monocytogenes* es de especial interés en España, puesto que afecta a la Industria de Alimentación y Bebidas, que es el primer sector industrial en facturación del país y un importante generador de empleo, representando el 2,4% del PIB. Además, la listeriosis ha sido incluida como enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en nuestro país en 2015. En este trabajo hemos investigado su presencia en el ambiente clínico (CAULE) y en muestras de alimentos de origen animal que están siendo introducidas clandestinamente en nuestro país a través de vuelos internacionales procedentes de países extracomunitarios, con el objetivo de conocer las características fenotípicas y genotípicas de los aislados que están circulando.

El estudio de epidemiología molecular de 17 aislados de *L. monocytogenes* causantes de infecciones invasivas en el CAULE durante un periodo de nueve años (2006-2014), demostró la existencia de un brote de listeriosis en Castilla y León que no había sido detectado con anterioridad, lo que destaca el valor que aportan este tipo de estudios en la detección prematura de brotes de listeriosis y en la localización de su origen, lo que permite limitar su impacto y evitar la dispersión del patógeno. Por otro lado, se detectaron los mismos clones de *L. monocytogenes* en las muestras de alimentos decomisados a los pasajeros del Aeropuerto de Bilbao, lo que confirma la existencia previamente descrita de un número pequeño de clones prevalentes con distribución mundial.

El último patógeno estudiado, *F. tularensis*, se engloba en el marco de la estrategia *One Health*, dentro de las zoonosis, como **riesgo biológico**. La tularemia constituye el ejemplo perfecto de que la salud del hombre, los animales, y el medio ambiente están

interconectadas. Este patógeno fue el agente causal de dos de los mayores brotes de tularemia en humanos descritos hasta el momento a nivel mundial, que tuvieron lugar en Castilla y León entre los años 1997-1998 y 2007-2008, afectando en conjunto a más de 1.000 personas. En este trabajo realizamos un estudio de epidemiología molecular desde una aproximación integral, estudiando los clones involucrados en la infección, tanto en los animales como en el hombre.

Los resultados corroboraron que ambos brotes fueron causados por el mismo grupo de genotipos relacionados, pertenecientes al subclado B.FTNF002-00, ampliamente distribuido en Europa Central y Occidental. Este dato apunta a que la reemergencia de la tularemia en España en el año 2007, tras 10 años sin actividad epidemiológica, no fue causado por la introducción de cepas exóticas, sino a la persistencia de reservorios locales de infección hasta el momento desconocidos, lo que sugiere la existencia de focos locales de tularemia en nuestra Comunidad Autónoma. Se detectaron los mismos genotipos de *Francisella tularensis* tipo B en todos los hospedadores estudiados, humanos y animales, por lo que no fue posible establecer qué especie o especies pudieran considerarse en sentido estricto el reservorio fundamental del patógeno en periodos interepidémicos.

La aplicación de la estrategia *One Health* al estudio de patógenos emergentes con relevancia en Castilla y León, tanto para la industria alimentaria como en el ámbito de la Salud Pública y la Sanidad Animal, nos ha permitido extraer conclusiones importantes, que permiten conocer la situación actual de los mismos en nuestra Comunidad Autónoma, ofreciendo información para el diseño y aplicación de estrategias de prevención y control efectivas que permitan evitar la diseminación de los patógenos y limitar su impacto. Estas investigaciones no habrían sido posibles sin la acción coordinada entre instituciones y profesionales de todos los ámbitos implicados, que ha aportado un valor añadido a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

Abstract

The “**One Health**” concept has resurfaced worldwide in the last decade to tackle health and welfare from a common framework. Nowadays, there are a number of circumstances (the exponential increase of the world population and demand for animal protein, extreme globalization, international transportation and trade, among others), that acting synergistically, make relationships between human, animal and environmental health closer than ever. Therefore, the existence of “wicked” problems requires inter, multi and transdisciplinary collaboration among professionals, private companies and government agencies within the field of work in all disciplines involved, in order to address them using a holistic approach which enables the design and implementation of effective control and prevention programs that limit their impact.

Encompassed in that context, the purpose of this Thesis is to address wicked problems of Public and Animal Health, and the food industry in Castile and Leon, studying the prevalence and main routes of transmission of four emerging pathogens that have an important impact on the economy of the region: *Mycoplasma* spp. involved in the contagious agalactia syndrome (CA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Listeria monocytogenes* and *Francisella tularensis*. The study of these pathogens is part of the One Health strategy as they either constitute a problem of food security, causing a decrease in the availability of animal proteins (*M. agalactiae* and *S. aureus*), or are zoonotic agents, contributing to the origin and spread of antibiotic resistance (MRSA), or constitute a risk to food safety (*L. monocytogenes*), or pose a risk of environmental exposure (*F. tularensis*).

Studies along this doctoral work have been published in 9 manuscripts, developed through interdisciplinary collaboration between our research institute, the “Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León” (ITACyL), and the “Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León” (LILCyL), the Faculty of Veterinary Medicine of the University of León, the Regional Laboratory of Animal Health (LRSA), the University Hospital of León (CAULE), the University Hospital of Valladolid, the International Airport of Bilbao and the Faculty of Food Science and Engineering in Galati (Romania).

Methodology included classical microbiological methods with molecular epidemiology techniques in order to achieve an added value to identify the factors that, in the physical and natural environment, affect the risk of developing a certain disease, and

are susceptible to preventive intervention by the competent authorities. Thus, molecular detection of pathogens was performed using conventional and real-time PCR systems, and genomic characterization by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multi-locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) and multi-locus sequence typing (MLST).

First, we investigated the presence of the four *Mycoplasma* spp. causing CA and *S. aureus* in dairy sheep farms in Castile and Leon. As part of the One Health strategy these pathogens are relevant in the context of **food security**, since they cause major losses in milk production of ruminants, being one of the main causes of mastitis. The presence of four *Mycoplasma* spp. was studied in 597 milk samples from the mixing tanks of 528 farms, between July 2009 and April 2010. *M. agalactiae* was the only species observed, so we continued with its detection up to a total of 1,798 samples of 1,313 farms located in 12 provinces, including 8 of Castile and Leon, from 2008 to 2010. *M. agalactiae* was detected in all the provinces studied, with a prevalence of 36.8% after enrichment of samples followed by real-time PCR, and 9.2% by microscopic observation after microbiological culture. Furthermore, the genomic characterization of 410 isolates by PFGE, MLST and VNTR showed a high genetic homogeneity, all belonging to genotype st-10 by MLVA and 92% of them to ST-5 by MLST, which confirms the presence of a clonal endemic population in our country. Our results in sheep were in contrast to the situation observed in goats, in which the four *Mycoplasma* spp. have been detected and *M. agalactiae* isolates showed high genetic diversity. Therefore, ovine and caprine CA present a different epidemiology in Spain. In turn, the presence of *S. aureus* was studied in 486 farms, showing a prevalence of 68.5%, which suggests that both pathogens could be causing large direct and indirect economic losses in the sheep sector of Castile and Leon. Furthermore, the high prevalence of *S. aureus* may have implications for Public Health, since this bacterium often carries antibiotic resistance genes, not to mention its pathogenic power associated with enterotoxin production, capable of producing episodes of food poisoning, although that last point has not been discussed in this work.

The emergence of **antibiotic resistant microorganisms** is a major concern worldwide because of its great socio-economic impact and implications for Public Health, compromising the treatment of diseases in the medium and long term. For this reason, it is one of the three priority issues of WHO-FAO-OIE alliance within the One Health strategy. Accordingly, we studied the presence of MRSA by a holistic approach, in the animal environment, on sheep farms in Castile and Leon, in clinical settings, and in the CAULE. The

presence of specific lineages of MRSA has been demonstrated in both food animals and their associated foodstuff. Consequently, we have also studied the role of illegal importation and sale of foods of animal origin to the EU from non-EU countries, in the dissemination of MRSA.

ST5 and ST125 (CC5-MRSA-IV) clones were the most prevalent (76.5%) in the CAULE during the years 2007-2008, which is in line with other studies carried out at the national level, and confirms the presence of an endemic clonal population in the Spanish clinical environment. Furthermore, we detected for the first time in Spain the presence of one isolate of MRSA harbouring the homologous gene *mecC* in livestock (sheep), from a total of 601 *S. aureus* isolates in 229 farms (0.4%). This discovery has important implications for Public Health, since routine methods used in hospitals for diagnosing MRSA fail to detect the *mecC* gene, which lead to inappropriate treatment of patients and underestimation of the prevalence of MRSA in hospitals.

On the other hand, community-associated and livestock-associated MRSA (CA-MRSA, LA-MRSA) clones (ST8-MRSA-IV and ST398-MRSA-IV/V, respectively) were detected in confiscated samples at the International Airport of Bilbao, and in a “grey” market in the Romanian border with the Republic of Moldova, which shows that the illegal importation and sale of foods to the EU from non-EU countries are routes of dissemination of antibiotic resistant microorganisms. Another interesting observation is that although LA-MRSA clones (ST130-MRSA-XI and ST398-MRSA-IV/V) were detected in sheep farms in Castile and Leon, as well as the introduction in Spain of CA-MRSA isolates (ST8-MRSA-IV) through illegal food imports in non EU-flights, none of these lineages were detected in the CAULE. These results, along with those obtained in previous studies in the Spanish clinical settings, suggest that despite the global emergence of these lineages, their presence at the moment is uncommon in the hospitals of our country.

Another important aspect of Public Health is the concept of **food safety**, which means that food must be safe for the population. Foodborne diseases are a major economic and Public Health problem worldwide. Of all zoonotic diseases investigated by the EU, listeriosis is responsible for the most serious cases, showing a hospitalization and mortality rate of 99.1% and 15.6%, respectively. Moreover, it has been observed for the fifth consecutive year a trend in the increase of cases in the EU-28, of 9.4% in 2013 over the previous year. The study of *L. monocytogenes* is of special interest in Spain, since it affects the food and beverage industry, which is the first industrial sector of the country in

turnover and an important generator of employment, accounting for 2.4% of GDP. Furthermore, listeriosis has been included as a notifiable disease (EDO) in our country in 2015. In this work, we investigated its presence in the clinical setting (CAULE), and in food samples of animal origin being smuggled into our country through international flights from non-EU countries, to study the phenotypic and genotypic characteristics of isolates that are circulating in our country.

The molecular epidemiology study of 17 isolates of *L. monocytogenes* causing invasive infections in the CAULE for a period of nine years (2006-2014), demonstrated the existence of an outbreak of listeriosis in Castile and Leon that had not been previously detected. This discovery highlights the value of this type of study in the early detection of outbreaks of listeriosis and of its origin, limiting their impact and avoiding the spread of the pathogen. On the other hand, the same clones of *L. monocytogenes* were observed in food samples confiscated from passengers at Bilbao's Airport, which confirms the previously described existence of a small number of prevalent clones with worldwide distribution.

The last pathogen which was studied, *F. tularensis*, is included as part of the One Health strategy within zoonosis, as a **biohazard**. Tularemia is the perfect example which shows that human, animal and environmental health are closely interconnected. This pathogen was the causative agent of two of the largest human tularemia outbreaks described so far worldwide, which took place in Castile and Leon in 1997-1998 and 2007-2008, affecting altogether over 1,000 people. In this work, we performed a molecular epidemiology study from a comprehensive approach, studying the clones involved in infection in both, animals and humans.

The results confirm that both outbreaks were caused by the same group of closely related genotypes belonging to subclade B.FTNF002-00, which is widely distributed in Central and Western Europe. These data suggest that the re-emergence of tularemia in Spain in 2007, after 10 years of epidemiological silence, was not caused by the introduction of an exotic strain, but by the persistence of local reservoirs of infection hitherto unknown, which suggests the existence of local *foci* of tularemia in our region. The same genotypes of *Francisella tularensis* type B were detected in all studied hosts, humans and animals, so it was not possible to establish what species might be considered the fundamental reservoir of the pathogen in inter-epidemic periods.

The implementation of the One Health strategy to study emerging pathogens with relevance in Castile and Leon, both for the food industry and in the field of Public and Animal Health, has enabled us to draw important conclusions that allow us to understand the current situation in our region, providing information for the design and implementation of effective control and prevention strategies to prevent the spread of pathogens and limit their impact. This research would not have been possible without the coordinated action between institutions and professionals from all areas involved, which has provided an added value to the results obtained in this Thesis.

Listado de abreviaturas

AC	Agalaxia contagiosa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
ARN	Ácido ribonucleico
BOCyL	Boletín Oficial de Castilla y León
BOE	Boletín Oficial del Estado
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad
canSNP	Polimorfismos de un solo nucleótido canónicos
CAULE	Complejo Asistencial Universitario de León
CC	Complejo clonal
CHAB	Agar corazón cisteína con sangre chocolatizada al 9%
ECDC	European Centers for Disease Control and Prevention
EDO	Enfermedad de Declaración Obligatoria
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con susceptibilidad intermedia heterogénea a glucopéptidos
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ámbito hospitalario
indels	Inserciones y deleciones
ITACyL	Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
kpb	Kilo pares de bases
LA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ganado
LILCyL	Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León
LRSA	Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Castilla y León
LVS	Cepa viva atenuada de <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>
MLST	Tipificación multi-locus de secuencias
MLVA	Análisis multi-locus de repeticiones en tándem de número variable
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases

PCC	Puntos de control crítico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
SCC _{mec}	Casete cromosómico estafilocócico <i>mec</i>
ST	Tipo de secuencia
TTP	Tratado de Asociación Transpacífico
TTIP	Tratado Transatlántico de Comercio e Inversiones
UE	Unión Europea
ufc	Unidades formadores de colonia
VNTR	Repeticiones en tándem de número variable
WGS	Secuenciación del genoma completo

Agradecimientos

A David, Marta y Elías, mis directores, gracias a los que he "madurado científicamente", y sin los cuales no había podido llegar hasta aquí. Me habéis brindado la oportunidad de dedicarme a algo que amo. Por ello, jamás os olvidaré.

A todos los profesionales que han colaborado en los estudios que forman parte de esta Tesis Doctoral, con especial mención a la Dra. Isabel, que siempre nos ha atendido con gran amabilidad, talento y predisposición para colaborar.

A los miembros del tribunal, por aceptar participar en la defensa de esta Tesis, a pesar de sus apretadas agendas.

A David "el becario", Bernar, Gislaine y Narciso, mis "compis de café", que me aportan a diario ese "break" tan necesario. Sois grandes personas y os deseo lo mejor. A Katarina y Marta, mis ex-compañeras de Tesis. Pasamos miles de horas juntos en el laboratorio y no os olvido a pesar de la distancia.

Al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, por facilitarme sus instalaciones para la realización de los experimentos, y a la Universidad de León, además de por este motivo, por la concesión de la beca PIFA con la que inicié esta Tesis.

A mi familia, a los que les debo, literalmente, todo en esta vida. A mis padres, por vuestro continuo apoyo e incansable sacrificio. Esta tesis, y todo lo demás, os lo debo a vosotros. A mi hermana María y a mi "otro hermano", Raúl, a los que tanto quiero.

A mi novia Gema, que tanto me ha enseñado y con la que tanto he compartido en estos cinco maravillosos años que llevamos juntos. Tú, mejor que nadie, sabes la intensidad y la pasión que he puesto en la realización de este proyecto, y lo mucho que significa para mí.

A mis mejores amigos. A Mónica y José Jesús, o como a ti te gusta "J", por toda la ayuda que me habéis prestado para hacer la portada, y a Erik y Alberto, dos de las mejores personas que he tenido la suerte de encontrarme en mi vida. Si algo he echado de menos todos estos años fuera de Zamora, aparte de a mi familia, ha sido a vosotros.

A todos vosotros va dirigida esta Tesis, con mi mayor cariño.

Gracias por todo.

Capítulo 1

Introducción

1.1 El concepto “One Health”

El concepto "One Health", "Una Sola Salud", o brevemente "Una Salud", se define como "el valor añadido, en términos de mejor salud y bienestar humano y animal, ahorro económico y mejores servicios ambientales, que se obtiene a través de la colaboración inter, multi y transdisciplinar entre profesionales e instituciones relacionadas con la Salud Pública, la Sanidad Animal, y otras disciplinas relacionadas, y que va más allá de los resultados que podrían ser obtenidos de forma independiente por cada una de las partes que lo conforman" (Zinsstag y cols., 2015). El término *One Health* fue acuñado a finales de los años 90, a raíz de la amenaza potencial de pandemia de la influenza aviar altamente patógena, con el fin abordar el problema desde una aproximación holística. Esta visión ha sido articulada a nivel internacional, a través de la alianza concertada de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), en lo que se denomina "el tripartito", con el propósito de abordar la salud y bienestar desde un marco común, definiendo claramente sus responsabilidades y objetivos. Actualmente, existen tres líneas prioritarias de actuación dentro de la estrategia *One Health*: la rabia, los virus zoonóticos de la influenza y la resistencia a los antimicrobianos (www.oie.int; www.who.int; www.fao.org).

A pesar de que el concepto *One Health* no es nuevo, el término ha sido acuñado y ha adquirido una gran relevancia internacional recientemente, debido a la toma de conciencia colectiva sobre el vínculo existente entre las enfermedades animales, la salud humana, y el medio ambiente en el que tienen lugar las interacciones entre ellos, en lo que ha sido denominado la interfaz hombre-animal-medio ambiente. Un claro reflejo de este vínculo, es que al menos el 60% de todos los patógenos humanos son zoonóticos, representando estos últimos el 75% de todos los patógenos emergentes en el hombre, y ocasionando enfermedades de gran relevancia como el síndrome respiratorio agudo grave, la gripe aviar, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, la enfermedad por el virus del Ébola, la fiebre del Nilo occidental, o la infección por el virus Nipah, entre otros (WHO 2005, *The Control of Neglected Zoonotic Diseases*; Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005; www.who.int/zoonoses). Existen muchos factores que han contribuido a la creciente necesidad de abordar los temas de Salud Pública desde el marco de la estrategia *One Health*. Algunos de los más importantes son: i) la globalización, que ha supuesto una intensificación de los viajes y el comercio internacionales, haciendo que los patógenos

puedan diseminarse en menos de 24 horas por todo el planeta; ii) el cambio climático, que ha permitido la colonización de los territorios nuevos por especies exóticas; iii) el aumento de la población mundial, que ha propiciado la colonización de nuevos hábitats, un aumento en la densidad de población, y la necesidad de llevar a cabo estrategias de agricultura y ganadería intensivas para satisfacer las necesidades mundiales de alimentación y nutrición; iv) los cambios en las conductas sociales, como el aumento en la adopción de mascotas (tanto animales domésticos como exóticos), que abre las puertas a la transmisión de enfermedades a través del contacto entre los animales de compañía y sus dueños, o el cambio en los hábitos de consumo, como el aumento exponencial que ha sufrido del mercado de productos listos para el consumo, los cuales poseen un mayor riesgo microbiológico inherente (www.cdc.gov/onehealth).

Por lo tanto, el enfoque o estrategia *One Health* implica la integración de múltiples disciplinas, e incluye no solo a los patógenos causantes de zoonosis, los cuales tienen un efecto evidente sobre la Salud Pública, sino a todos aquellos factores que, de forma directa o indirecta, tienen consecuencias negativas sobre ella o pueden ser utilizados para mejorarla. De esta manera, esta estrategia también engloba a las enfermedades animales no transmisibles al hombre que tienen efectos negativos en la producción de proteínas de origen animal, y en general en la disponibilidad de productos alimentarios de alta calidad nutricional, ya que tienen importantes repercusiones en la salud de las poblaciones (principalmente en países en vías de desarrollo), e incluso a la Medicina y Sanidad Animal como modelo de estudio de enfermedades humanas, o su utilización como indicadores de agentes o condiciones peligrosas para la Salud Pública. En la Figura 1, que es una adaptación del denominado “One Health Umbrella”, recientemente desarrollado por el equipo “One Health Sweden” en cooperación con la “Iniciativa One Health”, se representan todos los aspectos relevantes de este movimiento (www.onehealthinitiative.com).

La estrategia *One Health* se encuentra en la fase inicial de implementación, y aún quedan muchos esfuerzos para articular de forma efectiva esta ambiciosa iniciativa. El deseable éxito de este enfoque implica cambios a varios niveles, desde los que afectan a la perspectiva y el compromiso de las partes involucradas, a cambios en la planificación y comunicación, en la organización y en las capacidades de los profesionales, en la aplicación de los proyectos y la obtención de resultados, y finalmente en la sostenibilidad del cambio y el impacto (Hueston y cols., 2013). Esto a su vez implica a una gran diversidad de profesionales e instituciones de distintos campos, incluyendo el ámbito de la investigación

en salud humana, Sanidad Animal y sostenibilidad del medio ambiente, pero también a las ciencias humanas y políticas. Un reciente estudio llevado a cabo por Hueston y cols. (2013) ha puesto de manifiesto que para la adopción generalizada de esta iniciativa, se necesita llevar a cabo mayores esfuerzos estratégicos, reclutar un grupo más amplio de líderes en *One Health*, consolidar las asociaciones que se han establecido y unificar esfuerzos. Además, un factor esencial es el establecimiento de vías de comunicación entre todos los profesionales e instituciones públicas y privadas que tienen relación directa o indirecta con la Salud Pública.

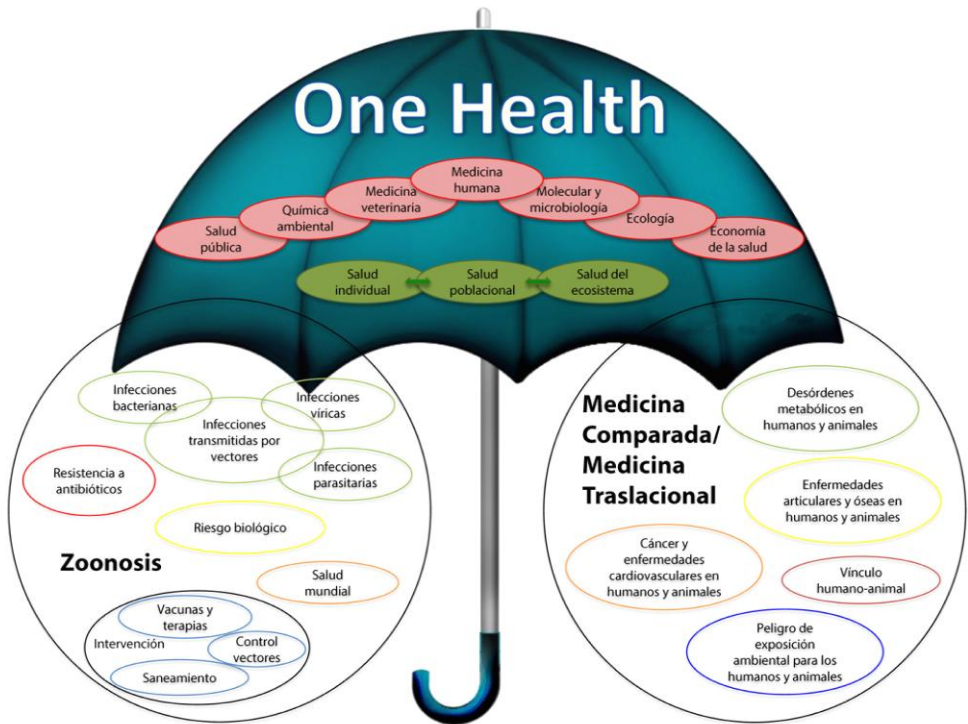


Figura 1. Aspectos relevantes de la estrategia *One Health*. Adaptación del "One Health Umbrella" desarrollado por el equipo "One Health Sweden" en cooperación con la "Iniciativa One Health"

A pesar de que históricamente han existido claros nexos de unión entre los médicos y los veterinarios, el aumento en la especialización y la creación de instituciones de investigación, fuentes de financiación y órganos de gobierno independientes, ha llevado en muchos casos a una pérdida de la comunicación, y consecuentemente, a una simplificación a la hora de tratar la salud y el bienestar del hombre y de los animales. Esta aproximación reduccionista lleva, en muchos casos, a perder la perspectiva global del problema, y tiene consecuencias negativas tanto a nivel económico como en materia de Salud Pública. Dos claros ejemplos de este hecho son los brotes de fiebre Q y fiebre del valle del Rift en humanos que tuvieron lugar en Holanda y Mauritania, respectivamente, y

1

que podrían haber sido prevenidos, o al menos se podría haber limitado su impacto, si los ganaderos y las autoridades veterinarias hubieran alertado de la presencia de los patógenos en las explotaciones de cabras y vacas de la zona (Digoutte y cols., 1999; Zinsstag y cols., 2007; Enserink y cols., 2010). En este sentido, se están llevando a cabo diversos eventos como reuniones, conferencias y nuevas iniciativas con el fin de fomentar la comunicación entre todas las partes implicadas (Bousfield y Brown, 2011; Papadopoulos y Wilmer, 2011), contexto en el que pretenden integrarse los estudios realizados en esta Tesis Doctoral, pues estos se han desarrollado a través de relaciones interdisciplinares entre nuestra institución, el "Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León" (ITACyL), y profesionales, universidades, empresas privadas e instituciones gubernamentales relacionadas con la salud humana y la Sanidad Animal, tanto en España como en la UE, con especial énfasis en la Comunidad Autónoma de Castilla y León (el Laboratorio Interprofesional Lácteo de Castilla y León (LILCyL), la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, el Laboratorio Regional de Sanidad Animal (LRSA), el Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE), el Hospital Clínico Universitario de Valladolid, el Aeropuerto Internacional de Bilbao y la Facultad de Ciencias de los Alimentos e Ingeniería de Galati (Rumanía)), y siempre con una clara vocación de abordar estas investigaciones desde una perspectiva multidisciplinar e integradora.

1.2 Relevancia de los patógenos emergentes en Castilla y León objeto de estudio de esta Tesis Doctoral

El propósito de esta Tesis Doctoral es dar respuesta a problemas tanto de Salud Pública, como de los sectores ganadero y alimentario en Castilla y León, desde el marco de la estrategia *One Health*, estudiando la prevalencia, tanto a nivel clínico como animal, y las principales vías de transmisión zoonótica, de cuatro patógenos emergentes que tienen un importante impacto tanto en la Salud Pública como en la Sanidad Animal y en la economía de la región: las especies del género *Mycoplasma* involucradas en el síndrome de la agalaxia contagiosa (AC), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Listeria monocytogenes* y *Francisella tularensis*. Los patógenos objeto de estudio se enmarcan dentro del movimiento *One Health* dado que, o bien constituyen un problema de seguridad alimentaria, causando una disminución en la disponibilidad de proteínas de origen animal, o bien son agentes zoonóticos, contribuyendo además al origen y dispersión de resistencias a antibióticos, constituyendo un riesgo para la inocuidad de los alimentos, u originando un peligro de exposición al medio ambiente (Figura 2).

La metodología utilizada para la consecución de los objetivos ha complementado los métodos microbiológicos clásicos, que siguen siendo a día de hoy fundamentales para la confirmación de las enfermedades mediante el aislamiento del agente etiológico, desde la formulación de los postulados de Robert Koch, con técnicas desarrolladas en los últimos años de epidemiología molecular, con el fin de obtener un valor añadido que permita identificar los factores que, dentro del entorno físico y ambiental, afectan al riesgo de padecer una enfermedad determinada y que son susceptibles de ser sometidos a una intervención preventiva por parte de las autoridades competentes. Desde que el término epidemiología molecular fue acuñado en 1973 por Edwin D. Kilbourne, en su artículo titulado "The molecular epidemiology of influenza" (Kilbourne 1973), su aplicación ha supuesto toda una revolución tanto en la investigación como en el ámbito de la práctica clínica. El avance espectacular de las técnicas moleculares en las últimas décadas ha permitido la detección precoz de brotes y del origen de los mismos, nuevos métodos de diagnóstico clínico más rápidos, sensibles y específicos, el estudio de las características genéticas de los linajes asociados con más frecuencia a enfermedad, estudios de genética de poblaciones, conocer los mecanismos moleculares involucrados en el éxito evolutivo de determinados patógenos, y otras muchas aplicaciones que han salvado incontables vidas.

En este contexto, en los estudios realizados en el seno de esta Tesis Doctoral se han utilizado una serie de herramientas moleculares tanto para la detección de los patógenos, que se ha realizado mediante sistemas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y PCR a tiempo real, como para la caracterización genómica de los mismos, mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), repeticiones en tándem de número variable (VNTR), también denominado análisis multi-locus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA) y tipificación multi-locus de secuencias (MLST), dependiendo del ámbito geográfico y temporal del estudio.

Tanto las especies del género *Mycoplasma* involucradas en la AC, como *S. aureus*, tienen un gran impacto en el sector ovino de Castilla y León, siendo una de las principales causas de mastitis y causando grandes pérdidas económicas (www.magrama.gov.es). El sector ovino de leche en esta Comunidad Autónoma es uno de los más importantes de Europa, produciendo el 60% de la leche de oveja de España, la cual a su vez ocupa la segunda posición en número de cabezas de ganado ovino entre los 28 países miembro de la UE (20% del total) (MAGRAMA. Caracterización del sector ovino y caprino en España 2013). Estos patógenos también poseen relevancia en materia de Salud Pública, ya que *M. agalactiae* causa la reducción, o incluso la supresión total de la producción láctea en las fases agudas del síndrome (Lambert, 1987; Bergonier y cols., 1997), lo que supone una disminución en la disponibilidad de proteínas de origen animal, y por lo tanto un riesgo para la seguridad alimentaria, tanto desde el punto de vista del abastecimiento, como por otras causas indirectas. Por su parte, *S. aureus*, y especialmente SARM, constituyen a día de hoy una de las mayores preocupaciones en Salud Pública, no solo en Castilla y León, sino a nivel mundial. Aparte de suponer un enorme gasto, que ha sido estimado en 380 millones de € anuales para los sistemas sanitarios europeos (Köck y cols., 2010), pone en grave riesgo el tratamiento de enfermedades a medio y largo plazo debido a la diseminación de la resistencia a antibióticos, uno de los puntos prioritarios de la estrategia *One Health* (www.oie.int).

Otro de los patógenos zoonóticos estudiados en esta Tesis Doctoral, *L. monocytogenes*, presenta gran relevancia en Salud Pública debido, por un lado, a su elevada tasa de mortalidad, que asciende hasta el 30% y más de los pacientes afectados con el condicionante común del riesgo asociado a situaciones de inmunodepresión (Rocourt y Bille, 1997), y por otro lado, al aumento de la incidencia de infecciones de transmisión alimentaria asociadas a este patógeno en los últimos cinco años (EFSA, 2015).

L. monocytogenes constituye una de las principales preocupaciones para la industria alimentaria, debido a los elevados costes que produce en el sector por el decomiso y la destrucción de los lotes que superan los niveles de presencia del patógeno marcados por la ley. Por tanto, el estudio de este patógeno es de especial interés en España, y particularmente en Castilla y León, ya que la industria de la alimentación tiene un gran peso económico en nuestra Comunidad Autónoma, suponiendo alrededor del 10% de las ventas netas anuales de productos alimentarios en España, por un valor aproximado de 9.000 millones de € (MAGRAMA, Informe Industria Alimentaria 2013-2014). Además, la listeriosis no ha sido enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en nuestro país hasta este año 2015 (BOE, núm. 65, 17 de marzo de 2015, págs. 24012-24015), por lo que se conocen muy pocos datos sobre su prevalencia y los linajes taxonómicos y filogenéticos que están circulando.

El último patógeno zoonótico estudiado, *F. tularensis*, es el paradigma de por qué es tan necesaria la implementación de la estrategia *One Health*. Este patógeno fue el agente causal de dos de los mayores brotes de tularemia en humanos descritos hasta el momento a nivel mundial, que tuvieron lugar en Castilla y León entre los años 1997-1998 y 2007-2008, afectando en conjunto a más de 1000 personas (De Mateo y cols., 1998; Martín y cols., 2007; Allue y cols., 2008). *F. tularensis* es capaz de infectar a más de 300 especies animales, utilizando a algunas de ellas como reservorios o vectores en la transmisión de la enfermedad (Keim y Wagner, 2009), además de la potencial utilización de reservorios ambientales, como el agua (Ellis y cols., 2002; Ughetto y cols., 2015). Por tanto, es fundamental su estudio desde una aproximación integral, investigando los clones involucrados en la infección, tanto en los animales como en el hombre, con el fin de identificar los principales reservorios animales y ambientales y adoptar medidas de prevención y control apropiadas.

En los apartados que siguen de esta memoria, se describen la etiología y principales características de los patógenos objeto de estudio de esta Tesis Doctoral y de las enfermedades que ocasionan, así como su epidemiología, diagnóstico y tratamiento, y programas de prevención y control, dentro del contexto en el que tienen relevancia en el marco de la estrategia *One Health*.

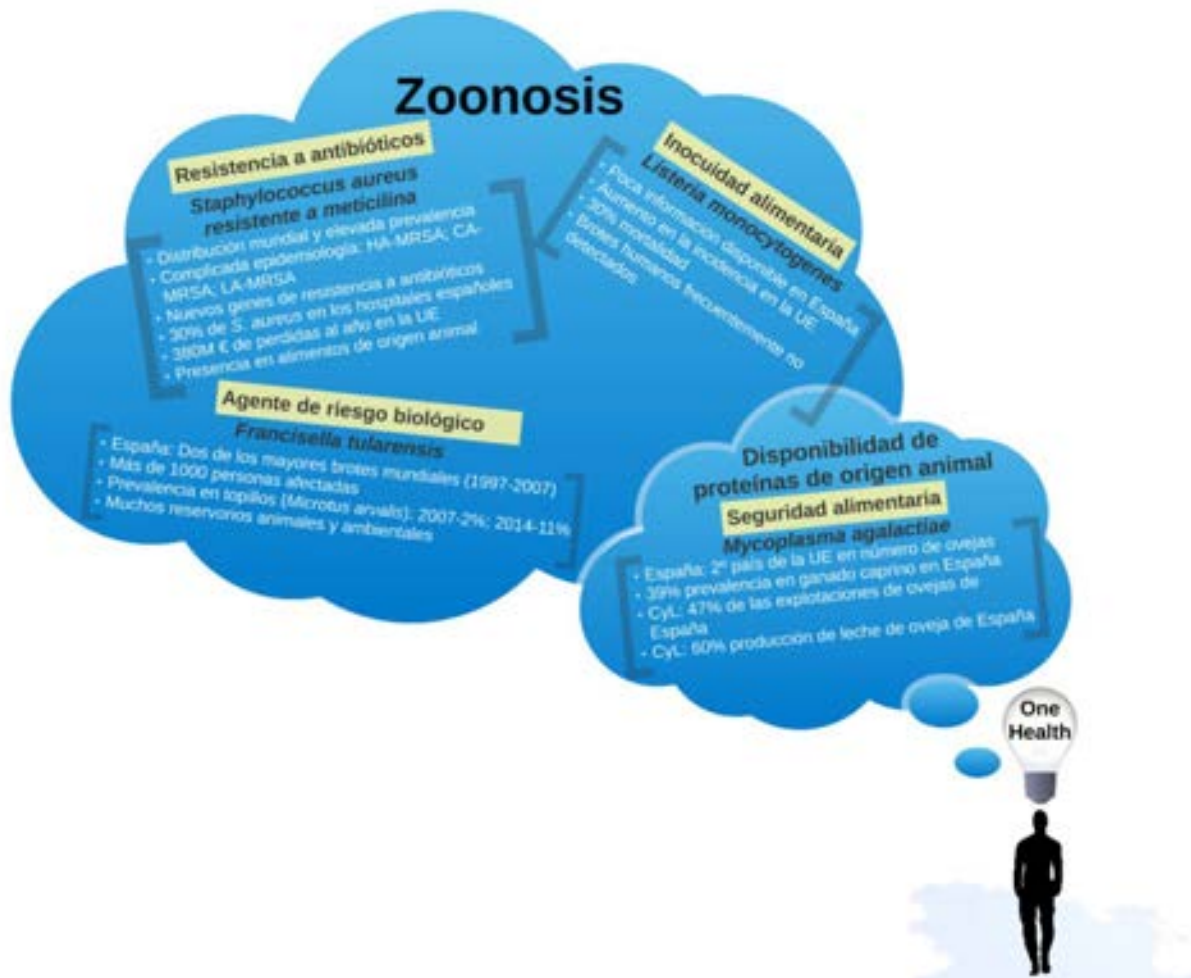


Figura 2. Relevancia en España, y particularmente en Castilla y León, de los cuatro patógenos estudiados en esta Tesis Doctoral dentro del marco de la estrategia *One Health*

1.3 Patógenos con relevancia en la disponibilidad de proteínas de origen animal

1.3.1 *Mycoplasma* spp. y agalaxia contagiosa

Etiología y principales características

Hasta el momento, se han descrito cuatro especies del género *Mycoplasma* involucradas en el desarrollo del síndrome de la agalaxia contagiosa (AC). Aunque se considera que *M. agalactiae* es el principal agente etiológico, se ha observado que *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* y *M. putrefaciens* también son capaces de causarlo especialmente en el ganado caprino, donde son más prevalentes (Bergonier y cols., 1997; Corrales y cols., 2007). El Comité Internacional de Sistemática de Procariotas, engloba estas cuatro especies en el género *Mycoplasma*, que pertenece taxonómicamente a la clase *Mollicutes* (literalmente de pared “blanda”), integrada por los microorganismos vivos autónomos más pequeños capaces de auto-replicarse (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 4). Estos microorganismos se caracterizan por no poseer pared celular, tener genomas muy pequeños con un bajo contenido en guanina y citosina, y mostrar necesidades nutricionales exigentes para su crecimiento. En la actualidad existe cierta controversia sobre la clasificación de estas especies, ya que los estudios filogenéticos posteriores han demostrado que *M. mycoides* subsp. *capri* y *M. capricolum* subsp. *capricolum* están evolutivamente más relacionadas con el género *Spiroplasma*, en el orden *Entomoplasmatales*, que con resto de miembros del género *Mycoplasma* (Manso-Silván y cols., 2007, 2009; Shahram y cols., 2010). Estos estudios sitúan *M. mycoides* subsp. *capri* y *M. capricolum* subsp. *capricolum* en el subgrupo filogenético *M. mycoides*, dentro del grupo *Spiroplasma*, y a *M. putrefaciens* estrechamente relacionado con este subgrupo. A la especie *M. agalactiae* la colocan en el grupo *Hominis*, el cual está alejado filogenéticamente del grupo *Spiroplasma* (Gómez-Martín y cols., 2013).

El síndrome de la AC es, junto con la perineumonía contagiosa bovina y la perineumonía contagiosa caprina, una de las tres enfermedades inducidas por especies del género *Mycoplasma* que afectan a rumiantes, de declaración obligatoria a la OIE debido a su impacto socio-económico (Chazel y cols., 2000; Kumar y cols., 2014). El síndrome fue descrito por primera vez en 1816 en Italia por Metaxa, y fue denominado AC por Brusasco en 1971, debido a que es altamente contagioso y normalmente cursa con la reducción de la

producción láctea. El patógeno puede ser transmitido fácilmente a través del contacto directo con secreciones auriculares, nasales u oculares, heces, orina, y exudados de lesiones articulares (Gomez-Martín y cols., 2012). La transmisión vertical, de la madre al feto, a través de calostro y leche contaminadas, y la sexual, mediante el semen de machos infectados, han sido también confirmadas (Lambert, 1987; Gómez-Martín y cols., 2012). La AC se caracteriza a nivel clínico por la aparición de mastitis, artritis, queratoconjuntivitis, y ocasionalmente abortos (Lambert, 1987; De la Fe y cols., 2005). El síndrome causa pérdidas económicas muy notables debido a la reducción o incluso supresión total de la producción de leche (agalaxia), a la aparición de abortos, a sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, y a los costes asociados con el diagnóstico, tratamiento y prevención, y se estima que superan los 20 millones de € anuales en los países europeos que forman la Cuenca Mediterránea, donde la enfermedad es endémica (Lambert, 1987; Bergonier y cols., 1997; Nicholas, 2002).

Con todo ello, la consecuencia más importante, y lo que le da relevancia dentro del movimiento *One Health* a pesar de tratarse de un patógeno animal no zoonótico, son las pérdidas ocasionadas en la producción láctea. En este sentido, existe muy poca información sobre el impacto que tienen las enfermedades endémicas del ganado, y en general de las enfermedades no infecciosas, a pesar de que de forma indirecta tienen importantes repercusiones en la Salud Pública y economía de las poblaciones. En este sentido, la OIE estima que la morbilidad y mortalidad causada por las enfermedades animales causa la pérdida de al menos el 20% de la producción ganadera a nivel mundial, lo que representa 60 millones de toneladas de carne y 150 millones de toneladas de leche, por un valor aproximado de 300.000 millones de \$ al año (www.rr-africa.oie.int/en/news/index.html).

Epidemiología de la agalaxia contagiosa

La AC tiene su mayor incidencia en los países de la Cuenca Mediterránea, donde se considera endémica, aunque se encuentra ampliamente distribuida en los cinco continentes: en la Cuenca Mediterránea en Europa, en el oeste de Asia, en países del centro, norte y este de África, y en Estados Unidos y Brasil en el continente americano (Kinde y cols., 1994; De Azevedo y cols., 2006; Al-Momani y cols., 2011). De esta forma, el síndrome ha sido detectado en Australia, Bulgaria, España, India, Irán, Iraq, Jordania, Turquía, Mongolia, Nigeria, Rusia, Senegal, Serbia, Sudán y Suiza, siendo endémico en muchas partes del mundo (Figura 3) (Kumar y cols., 2014). La presencia de este síndrome en

En España, la AC es una de las enfermedades más antiguas que se conocen. Ya en 1574, en las Leyes y Ordenanzas del Honrado Concejo de la Mesta, organización de pastores que fue creada en 1273 por Alfonso X el Sabio, se menciona una enfermedad del ganado ovino que cursa con la supresión de la producción láctea (Díez-Navarro y cols., 1994). En 1974, el Dr. Felix Talegón Heras publicó en las hojas divulgadoras del antiguo Ministerio de Agricultura un informe sobre la “agalaxia contagiosa de ovejas y cabras”, en el que queda patente que ya por aquel entonces la AC constituía un problema grave en las explotaciones de ovino y caprino de España, y en particular de Castilla y León. En el mismo, se recogían los datos del “Boletín Zoonosanitario” publicado por la otrora Subdirección General de Sanidad Animal, y presenta un listado de las provincias afectadas por la enfermedad durante los años 71, 72 y 73, apareciendo un total de 25, 16 y 25 provincias afectadas, respectivamente, de las cuales 7, 6 y 7 pertenecían a Castilla y León (Talegón-Heras, 1974). Como medida de control a esta circunstancia, en los Boletines Oficiales del Estado (BOE) de los años 72, 73 y 75, se “declaraban las provincias de tratamiento obligatorio contra la AC a la vista de los informes epizootiológicos suministrados por los servicios veterinarios de Sanidad Animal y Jefaturas Provinciales de Producción Animal”, entre las que figuraban un total de 9, 17, y 29 provincias (4, 6, y 8 pertenecientes a Castilla y León) (BOE, núm. 188, 7 de agosto de 1972, págs. 14311-2; BOE, núm. 244, 11 octubre 1973, págs. 19674-5; BOE, núm. 35, 10 febrero 1975, págs. 2810-1). Ya en la década de los 80, como parte de los estudios de Tesis Doctoral de Amparo Goncer Coca, dirigidos por el Prof. Elías F. Rodríguez Ferri, se analizaron entre 1980 y 1983 un total de 745 muestras de leche de 20 provincias (con mayor representación de muestras de Toledo, Valladolid y Cuenca), y en el periodo 1984-1986, otras 336 muestras de leche de 13 provincias (principalmente de Madrid, Toledo y Cuenca). De ellas aislaron un total de 141 cepas de *Mycoplasma* spp., siendo Valladolid la segunda provincia con mayor número de cepas aisladas (11,3%), por detrás de Toledo (26,24%). Por otro lado, la AC ha sido ampliamente estudiada en el ganado caprino de nuestro país por el grupo de investigación liderado por el Prof. José Bismarck Poveda Guerrero, que durante las últimas tres décadas ha estudiado la situación del síndrome en varias regiones, incluyendo las Islas Canarias, Extremadura y la región murciano-granadina (Real y cols., 1994; Gil y cols., 1999; Assunção y cols., 2004; Corrales y cols., 2004; De la Fe y cols., 2005, 2007). Uno de sus estudios microbiológicos llevado a cabo entre 2001 y 2002 en explotaciones de ganado caprino, reveló que el 38,5% de las explotaciones eran positivas a la presencia del patógeno, y en el 40% de los casos el microorganismo aislado fue *M. agalactiae* (De la Fe y cols., 2005). En conjunto, todos estos resultados sugieren una prevalencia elevada del patógeno en España, que tiene por su

parte gran relevancia para Castilla y León, ya que es la Comunidad que presenta la mayor producción de leche de oveja del país. Consecuentemente, en este trabajo hemos estudiado la situación actual de la AC en explotaciones de ganado ovino de Castilla y León, con el propósito de ofrecer información que permita a los responsables de Sanidad Animal tomar medidas para el control y la prevención de la enfermedad.

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la AC se basa en primera instancia en la observación de su cuadro clínico: lesiones articulares, mastitis, queratoconjuntivitis, disminución de la producción láctea (hasta agalaxia), y/o el aumento en la tasa de abortos y muertes fetales. En los casos sospechosos, se recogen muestras biológicas (exudados articulares, sangre, leche, semen, orina, y/o secreción auricular, nasal, ocular o vaginal) de los animales potencialmente infectados (Corrales y cols., 2007; Gómez-Martín y cols., 2012). La detección de las especies de *Mycoplasma* causantes de la AC se puede llevar a cabo mediante diversas metodologías, que incluyen el uso de técnicas microbiológicas, el diagnóstico serológico, y técnicas de detección molecular (Kumar y cols., 2014). En general, se recomienda el uso de las técnicas de detección molecular, ya que la identificación microbiológica tiende a subestimar la prevalencia debido a los exigentes requisitos de crecimiento de los micoplasmas, y la serología no es un método apropiado en áreas donde se realiza de forma habitual la vacunación sistemática de los rebaños, como es el caso de España. En cualquier caso, el aislamiento y caracterización microbiológica no debe ser sustituido, sino complementado por otras técnicas.

En los últimos años se han desarrollado múltiples sistemas de PCR que permiten la detección de todas las especies de *Mycoplasma* involucradas en el síndrome (Peyraud y cols., 2003; Woubit y cols., 2007; Oravcová y cols., 2009; Sanna y cols., 2014). De igual manera, la caracterización molecular de los aislados también puede ser llevada a cabo mediante varias metodologías. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se considera el método estándar para el genotipado de la mayoría de bacterias y hongos, y ha demostrado su robustez y poder de discriminación para el tipado de la mayoría de especies del género *Mycoplasma* (Marois y cols., 2001; McAuliffe y cols., 2004; Tardy y cols., 2007), incluyendo *M. agalactiae* (McAuliffe y cols., 2008). Además, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de genotipado basadas en la secuenciación, como las repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y la tipificación multi-locus de secuencias (MLST) (McAuliffe y cols., 2008, 2011). La principal ventaja de estas técnicas es

que los resultados pueden compararse con facilidad entre laboratorios, y no requieren personal específicamente entrenado, como ocurre en el caso de la PFGE.

El tratamiento de los animales infectados se basa fundamentalmente en el uso de antibióticos, principalmente macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos (Hirsh, 2000). Estudios recientes de susceptibilidad a diferentes tipos de antimicrobianos han demostrado que la enrofloxacin, ciprofloxacina, tilosina y doxiciclina son efectivos contra *M. agalactiae* (Paterna y cols., 2013). Por otro lado, como los micoplasmas no poseen pared celular, los antibióticos β -lactámicos carecen de efectividad. Además, otros estudios recientes han revelado que los aislados de *M. agalactiae* poseen una elevada resistencia a eritromicina, lo que sugiere un mecanismo intrínseco de resistencia, razón por la que su uso contra estos patógenos está contraindicado (De Garnica y cols., 2013; Paterna y cols., 2013; Filioussis y cols., 2014). En los últimos años, el uso masivo de estos antimicrobianos en el ganado ha llevado a la aparición de cepas resistentes, principalmente a macrólidos y fluoroquinolonas (Furneri y cols., 2001; Lysnyansky y cols., 2009), hecho que constituye un grave problema de Salud Pública.

Estrategias de prevención y control

La AC, como su nombre indica, es un síndrome muy contagioso y difícil de erradicar una vez que afecta a un rebaño, por lo que la mejor estrategia de control es prevenir su entrada. Los micoplasmas son excretados por los animales enfermos en varios fluidos corporales, lo que promueve la dispersión rápida de la infección a otros animales del rebaño, razón por la que la respuesta rápida es crítica para prevenir la diseminación del patógeno a los animales sanos (Corrales y cols., 2007; Kumar y cols., 2014). Además, las buenas prácticas de manejo y la desinfección rutinaria de los equipos de ordeño son claves para prevenir la diseminación. Sobre esta base, es necesaria la puesta en funcionamiento de programas de monitorización y vigilancia permanentes con el fin de detectar precozmente la presencia del patógeno, ya que a día de hoy, la participación en el programa para la obtención de calificaciones sanitarias para la AC es de carácter voluntario en Castilla y León, lo que dificulta conocer la situación real de las explotaciones (BOCYL, núm. 56, 22 de marzo de 2011, págs. 20062-20064).

Tras la sospecha de un caso de AC, los animales presuntamente infectados deben de ser puestos en cuarentena inmediatamente hasta confirmar la presencia del patógeno, en cuyo caso se recomienda el sacrificio de todos los animales positivos, y de aquellos que

han estado en contacto con ellos. Además, antes de introducir animales importados en el rebaño, la OIE recomienda solicitar un certificado veterinario internacional que atestigüe que el animal “no ha mostrado signos clínicos de AC el día del traslado, ha vivido desde su nacimiento o durante los últimos 6 meses antes del traslado en un establo donde no se ha detectado la presencia de AC durante ese periodo, y ha sido puesto en cuarentena los 21 días antes del traslado” (OIE, Terrestrial Animal Health Code 2010). Es importante tener en cuenta que la AC suele cursar de forma crónica en áreas endémicas, como sucede en España, y que los animales infectados son frecuentemente asintomáticos comportándose como hospedadores que excretan el microorganismo en la leche de forma intermitente (Lambert, 1987; Corrales y cols., 2007).

Hay disponibles varias vacunas contra la AC, tanto vivas como inactivadas, que inducen respuesta humoral y celular específica y no específica. En 1952, D. Cayetano López y López, uno de los más grandes veterinarios castellanos del siglo pasado, describe la preparación de una vacuna frente a la AC que afirma había sido utilizada en más de 60.000 ovejas con resultados muy satisfactorios (López C, 1952). Sin embargo, hoy en día se observan con frecuencia fallos en la protección contra el patógeno a pesar de la vacunación (De la Fe y cols., 2007a, 2007b; Buonavoglia y cols., 2008, 2010). En general, parece que las vacunas vivas atenuadas son más efectivas produciendo una respuesta inmune que proporciona protección más eficiente y duradera, por periodos de tiempo más largos que las inactivadas. Sin embargo, estas vacunas se utilizan con menor frecuencia ya que causan más efectos secundarios derivados de los adyuvantes (Buonavoglia y cols., 2008). También es frecuente el uso de autovacunas con aceites minerales como adyuvante, aunque al menos en Castilla y León los resultados cuestionan su eficacia, ya que las pruebas serológicas han mostrado una seroconversión de tan solo el 20% (DVM Fernando Martínez, comunicación personal).

Esta Tesis Doctoral, en el contexto que ha sido referido (Una Salud), habida cuenta del interés de la enfermedad por su difusión y los efectos negativos en la producción lechera, pretende contribuir al conocimiento actual de la AC en España, principalmente en Castilla y León, además de proporcionar información de interés en relación con su etiología, incluyendo especies y variantes implicadas, que permita diseñar y establecer medidas de prevención y control adecuadas por la autoridad competente, que limiten las pérdidas en nuestro importante sector de ovino de leche.

1.4 Patógenos causantes de zoonosis

1.4.1 Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM)

Etiología y principales características

El género *Staphylococcus* comprende 35 especies y 17 subespecies de bacterias Gram-positivas de forma esférica, aisladas o en cadena, y con una serie de caracteres fisiológicos y bioquímicos característicos, la mayoría de ellas capaces de colonizar al hombre y a muchas especies animales en piel y mucosas. Entre ellas, *S. aureus* es la especie más virulenta, causando un amplio rango de enfermedades que van desde infecciones leves de piel a enfermedades mortales, como el síndrome del shock tóxico, septicemia, endocarditis y neumonía necrotizante (Lowy, 1998). *S. aureus* es una especie del género con forma de coco, anaerobia facultativa, Gram-positiva, productora de coagulasa y catalasa, inmóvil y no formadora de esporos. Se estima que alrededor del 30% de los individuos sanos están colonizados en piel y mucosas por este patógeno primario y oportunista (Lozano y cols., 2011), que produce alrededor de 240.000 casos de enfermedades de origen alimentario en los Estados Unidos, representando una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria de origen bacteriano (Hanson, 2011; Scallan y cols., 2011). En Europa, el último informe publicado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), sobre las tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos, y brotes alimentarios en el año 2013, puso de manifiesto que las intoxicaciones causadas por las enterotoxinas estafilocócicas son responsables del 7,4% de todos los brotes informados por la UE (EFSA, 2015). Además, *S. aureus* es un portador frecuente de genes de resistencia a antibióticos, circunstancia que a corto plazo, complica el tratamiento y aumenta de forma significativa los costes de su control, y a medio y largo plazo, compromete el tratamiento de este tipo de infecciones. Actualmente, *S. aureus* resistente a metilina (SARM) presenta distribución mundial, y constituye uno de los motivos de preocupación más importantes en materia de Salud Pública a nivel global, debido a su compleja epidemiología y su capacidad para adquirir o desarrollar nuevos mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos.

SARM fue descrito por primera vez en 1960, solo un año después de la inclusión de la metilina en la práctica clínica para tratar las infecciones causadas por la emergencia de

las cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina (Jevons y cols., 1961). Su resistencia a la meticilina está mediada por la presencia de los genes *mecA* o *mecC*, los cuales codifican una proteína adicional de unión a la penicilina (designada PBP2a o PBP2'), que presenta una baja afinidad por los antibióticos del grupo de β -lactámicos (Matsuhashi y cols., 1986; García-Álvarez y cols., 2011). Estos genes están integrados en un elemento genético móvil, el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), cuya transmisión a cepas evolutivamente eficientes de *S. aureus* sensible a meticilina (SASM) llevó a la emergencia de los linajes de SARM ancestrales (Katayama y cols. 2000). Hasta el momento se han descrito 11 tipos de SCC*mec*, definidos por la combinación de la estructura genética del complejo del gen *ccr*, con el complejo del gen *mec*. A su vez, existen subtipos basados en los polimorfismos de las regiones "J" (www.sccmec.org/Pages/SCC:TypesEN.html). Por lo tanto, a la hora de tipificar los aislados de SARM se caracterizan no solo por su genotipo, sino también por la estructura genética de su elemento SCC*mec* (Enright y cols., 2002).

La ontogenia de SARM, así como el origen de el determinante de resistencia *mec*, no están claros. Algunos estudios sugieren que el ensamblaje y adquisición del elemento SCC*mec* por *S. aureus* podría haber involucrado varios hospedadores, posiblemente a partir de estafilococos coagulasa-negativos (Archer y cols., 1994; Oliveira y cols., 2002). Los principales clones epidémicos de SARM parecen haber surgido de linajes de SASM adaptados evolutivamente, tras la transferencia del elemento *mec* (Enright y cols., 2002).

Epidemiología de las infecciones causadas por SARM

La epidemiología de SARM es extremadamente compleja y, en las últimas décadas, se ha convertido en uno de los mayores problemas de Salud Pública a nivel mundial. De hecho, la emergencia de la resistencia a los antibióticos es uno de los puntos prioritarios tanto en el marco de la estrategia *One Health*, como en países como Reino Unido, donde se han establecido políticas nacionales de alta prioridad para combatir la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos (www.gov.uk/government/collections/antimicrobial-resistance-amr-information-and-resources). Los factores principales que han influido en este hecho son:

1. Su dispersión mundial y el aumento significativo de su prevalencia.
2. La emergencia de determinados linajes en los ambientes comunitarios (en individuos sanos, de forma asintomática, y actuando como reservorios del

patógeno) y en animales, tanto en aquellos destinados a la producción de alimentos, como en los animales de compañía.

3. La detección del patógeno en alimentos de origen animal, lo que constituye un riesgo para la inocuidad alimentaria, contribuyendo a la dispersión de las cepas mejor adaptadas evolutivamente.
4. La importancia de la globalización (especialmente del transporte y comercio internacionales) en la dispersión del patógeno.
5. El uso masivo de antibióticos, que ha llevado a la adquisición de nuevos genes de resistencia que ponen en peligro el tratamiento a medio y largo plazo.

En primer lugar, la dispersión global de SARM ha tenido lugar muy rápidamente y, en la actualidad, se observan infecciones por este agente en prácticamente todas las partes del mundo. Se estima que estas infecciones representan gastos adicionales de entre 5.000 y 20.000 € por paciente, lo que supone alrededor de 380 millones de € al año para los sistemas sanitarios europeos (Köck y cols., 2010). Además, la prevalencia de SARM ha aumentado significativamente desde su aparición en 1960, aunque varía enormemente entre países, provincias, e incluso hospitales. En los Estados Unidos, del total de infecciones causadas por *S. aureus*, las causadas por SARM han aumentado del 4% en los años 80, al 50% a finales de los 90 (Oliveira y cols., 2002). En los peores casos, como sucede en Taiwán desde el año 1998, el 80% de los aislados de *S. aureus* responsables de infecciones nosocomiales han sido confirmados como SARM (Wang y cols., 2007). En España, cinco estudios de prevalencia han mostrado que las infecciones causadas por SARM han aumentado del 1,5% en 1986, al 31,2% en el 2002, lo que pone en evidencia la importancia actual de este patógeno en nuestro país (Cuevas y cols., 2004).

Por otra parte, hasta mediados de la década de los 90, la presencia de SARM se restringía al entorno hospitalario (hospital-acquired MRSA, HA-MRSA), pero después de este año, se encuentra cada vez con mayor frecuencia en la comunidad (community-acquired MRSA, CA-MRSA) (Vandenesch y cols., 2003). En comparación con HA-MRSA, las cepas CA-MRSA se aíslan con frecuencia de niños y jóvenes sanos, y muestran características genéticas y fenotípicas específicas: pertenecen a determinados genotipos, albergan los tipos de *SCCmec* IV o V, los cuales son más pequeños y les confieren con una ventaja selectiva en términos de una replicación más rápida, presentan mayor virulencia mediada por factores como la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), y normalmente no presentan multiresistencia a antimicrobianos (Otter y cols., 2010). Sin embargo, la

introducción recurrente de cepas CA-MRSA en el entorno clínico ha difuminado la frontera entre HA-MRSA y CA-MRSA, haciendo cada vez más difícil discriminar entre ellos (Tenover, 2006). La emergencia de los linajes CA-MRSA tiene una gran importancia en la epidemiología de SARM dificultando la prevención y control de las infecciones, ya que colonizan de forma asintomática al ser humano que actúa como reservorio del patógeno. Además, desde el año 2005 se han detectado aislados de SARM del tipo de secuencia (ST) 398, capaces de colonizar cerdos y humanos relacionados profesionalmente con la cría de estos animales en varios países europeos (Voss y cols., 2005; Witte y cols., 2007). Estudios posteriores han revelado también la presencia de este linaje en otros animales destinados a la producción de alimentos, y por tanto ha sido designado como SARM asociado al ganado (livestock-associated MRSA (LA-MRSA)). Estas cepas actúan como reservorios genéticos de resistencia, y podrían jugar un papel muy importante en la evolución adaptativa de SARM; de hecho, el gen de resistencia a meticilina *mecC*, recientemente descubierto, fue detectado originariamente en ganado bovino, y en la actualidad se detecta cada vez con más frecuencia en el entorno hospitalario como causa de infección (García-Álvarez y cols., 2011; Shore y cols., 2011; Pantosti, 2012).

En tercer lugar, la emergencia de SARM en los animales de producción ha suscitado gran preocupación respecto al papel potencial de los alimentos asociados como vehículos de infección, o en la diseminación de los linajes más adaptados evolutivamente. A pesar de que la EFSA considera que el riesgo de contraer infecciones por SARM a través de los alimentos es bajo, varios estudios han demostrado formalmente la existencia de infecciones transmitidas por alimentos y, por tanto, estos no deberían descartarse como ruta potencial de transmisión de estas variantes de *S. aureus* (Kluytmans y cols., 1995; Jones y cols., 2002).

En cuarto lugar, el nivel de globalización alcanzado en el siglo XXI facilita la dispersión de los microorganismos patógenos, especialmente a través del transporte y comercio internacionales, aunque también están implicados otros muchos factores (Mangili y Gendreau, 2005). Sin embargo, no existen estudios que evalúen la contribución real de estas rutas de transmisión en la diseminación geográfica de SARM.

Finalmente, el uso masivo de los antibióticos, tanto en la Medicina Humana como en Sanidad Animal y en producción vegetal, ha facilitado la adquisición de nuevos genes de resistencia que ponen en peligro el tratamiento a medio y largo plazo. Existen casos clínicos causados por cepas de SARM multiresistentes, en los que el único tratamiento

1

posible es mediante el uso de antibióticos glucopéptidos, como la vancomicina. Este grupo de antibióticos, junto con fármacos experimentales en investigación, se consideran la última línea de defensa en estas ocasiones. Por este motivo, la emergencia en los últimos años de cepas con susceptibilidad reducida a los glucopéptidos (*S. aureus* con susceptibilidad intermedia heterogénea a glucopéptidos, glycopeptide-intermediate *S. aureus*, GISA) (Sakoulas y Moellering, 2008), es motivo de gran preocupación a nivel internacional (Hiramatsu y cols., 1997).

Diagnóstico y tratamiento

La identificación de SARM se lleva a cabo mediante diversas metodologías incluyendo el cultivo de la muestra en medios de laboratorio selectivos; pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, por difusión en disco, microdilución en caldo y dilución en agar; detección de genes *mecA/mecC* por PCR; y mediante la detección de la proteína PBP2a mediante aglutinación. Es importante tener en cuenta que los aislados de SARM con el gen *mecC*, pueden ser diagnosticados equivocadamente como SASM debido a la divergencia de este gen con su homólogo *mecA* (69% y 63% de identidad a nivel de ADN y aminoácidos, respectivamente), con graves consecuencias para los pacientes y sesgando la monitorización de su prevalencia (Paterson y cols., 2014a). Por tanto, es necesario introducir nuevas herramientas más fiables para la detección de estos aislados, como el sistema de PCR multiplex desarrollado por Stegger y cols. (2012), que permite la detección de ambos genes; además, se ha demostrado que la cefoxitina es más fiable que la oxacilina en la detección fenotípica de SARM con el gen *mecC*, como consecuencia de las notables diferencias que existen en las propiedades de las proteínas codificadas por ambos genes (Kim y cols., 2012; Skov y cols., 2014).

Como hemos destacado antes, los aislados de SARM se caracterizan genéticamente tanto por su genotipo, como por el tipo de SCC*mec* (Enright y cols., 2002). En los últimos años se han desarrollado varios métodos para determinar el genotipo de SARM. La PFGE se utiliza frecuentemente para identificar las relaciones filogenéticas de aislados de un brote reciente, con el fin de localizar su origen (McDougal y cols., 2003); sin embargo, este método no es apropiado para estudios epidemiológicos o poblacionales a largo plazo, ya que los *loci* que evolucionan rápidamente son susceptibles de sufrir homoplasia, y las relaciones filogenéticas observadas mediante este procedimiento podrían estar en alguna medida sesgadas debido a posibles eventos de evolución convergente. En estos casos, el tipado *spa*, y el MLST son más apropiados, ya que miden la

diversidad en genes de expresión constitutiva que están evolutivamente más conservados (Enright y cols., 2000). Por otro lado, el tipado del elemento *SCCmec* se puede realizar mediante sistemas de PCR multiplex, que están basados en la amplificación de las regiones variables del complejo de genes *ccr* o *mec*, y en estructuras específicas de las regiones J (Oliveira y Lencastre, 2002; Kondo y cols., 2008; Shore y cols., 2011).

El tratamiento de las infecciones causadas por aislados de SARM varía dependiendo de su gravedad. En el caso de infecciones cutáneas leves que no se hayan diseminado a otras partes del cuerpo, drenar la infección puede ser el único tratamiento necesario. En el caso de infecciones más graves, los resultados de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos indicarán los antibióticos de uso preferente para el tratamiento. Las infecciones causadas por cepas multiresistentes se tratan con antibióticos glucopéptidos, como la vancomicina. El uso de este grupo de antimicrobianos debe reservarse a casos justificados, con el fin de evitar la emergencia de cepas GISA (Sakoulas y Moellering, 2008).

Estrategias de prevención y control

En el entorno sanitario, los programas prevención y control de las infecciones nosocomiales causadas por SARM se basan fundamentalmente en medidas de higiene, limpieza y esterilización de quirófanos y manejo adecuado de los dispositivos y equipos de atención al paciente, especialmente de aquellos invasivos, como los catéteres (Siegel y cols., 2007). En el entorno comunitario, se consideran conjuntos de alto riesgo los usuarios de drogas inyectables, las poblaciones indígenas, los presos, las comunidades de bajo nivel socioeconómico, los homosexuales, los jugadores de deportes de contacto y los niños (Otter y French, 2010). La monitorización y descolonización de los portadores asintomáticos que actúan como reservorios del patógeno constituye una medida crítica, con el fin de limitar la dispersión del mismo al entorno clínico. En la prevención y control de SARM en los animales destinados al consumo humano, la higiene es de nuevo una pieza fundamental para limitar la diseminación del patógeno. Sin embargo, apenas existe información sobre los factores de riesgo y las vías de transmisión de LA-MRSA, aunque es probable que estos sean los mismos que para la diseminación de la mastitis causada por *S. aureus*, como las maquinas de ordeño y el personal de trabajo (Vanderhaeghen y cols., 2010).

1

En resumen, el control y la prevención de las infecciones causadas por SARM supone en la actualidad un gran reto para las autoridades sanitarias y de Salud Pública debido a su complicada epidemiología, y requieren de una estrategia común en salud humana y Sanidad Animal dentro del marco *One Health*, así como conocer los principales reservorios y rutas de transmisión y diseminación del patógeno. Consecuentemente con ello, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo cuatro estudios con el fin de conocer la prevalencia y características genéticas de los aislados de SARM que están circulando tanto en el ámbito clínico, como asociadas al ganado en Castilla y León, además de evaluar el papel potencial de los alimentos de origen animal, y de los vuelos y comercio internacionales en la transmisión de SARM, tanto en España como en la UE.

1.4.2 *Listeria monocytogenes* y la listeriosis

Etiología y principales características

La listeriosis es una zoonosis causada por *Listeria monocytogenes*. El género *Listeria* comprende hasta la fecha un total de 17 especies, muchas de ellas descritas recientemente: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtaie*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. gryensis*, *L. fleischmannii*, *L. booriae*, y *L. newyorkensis* (Graves y cols., 2010; Leclercq y cols., 2010; Bertsch y cols., 2013; Den Bakker y cols., 2013; Halter y cols., 2013; Weller y cols., 2015). Estos microorganismos se describen como bacilos no formadores de esporos, Gram-positivos, anaerobios facultativos y productores de catalasa. Entre ellos, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenos y causan enfermedad. La primera especie produce listeriosis tanto en animales como en el hombre, mientras que *L. ivanovii* produce listeriosis en los animales, principalmente en rumiantes, aunque puntualmente se han descrito casos en humanos (Guillet y cols., 2010).

La listeriosis es una enfermedad poco frecuente tanto en animales como en humanos, probablemente debido a que su virulencia relativa hace que solamente sea capaz de vencer las barreras defensivas del hospedador en determinados grupos de individuos, calificados como de riesgo. El último informe de la EFSA y el ECDC en tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes alimentarios, informó de una incidencia de 0,44 casos de listeriosis por cada 100.000 habitantes en la UE en el año 2013 (EFSA, 2015). Sin embargo, la enfermedad tiene relevancia clínica debido a su elevada tasa de mortalidad, que puede alcanzar valores de hasta el 30% de las personas infectadas (Rocourt y Bille, 1997). Las infecciones que se dan en individuos previamente sanos, con un sistema inmune funcional, normalmente son leves y autolimitantes, cursando con síntomas leves como gastroenteritis febril (Ooi y Lorber, 2005); sin embargo, en determinados grupos de riesgo como mujeres embarazadas, recién nacidos, pacientes inmunodeprimidos y la tercera edad, la enfermedad puede ser mortal, pudiendo causar abortos, encefalitis, meningitis y septicemia (Drevets y Bronze, 2008).

La enfermedad se adquiere principalmente por el consumo de alimentos contaminados, especialmente alimentos frescos y listos para el consumo que no sufren ningún tipo de tratamiento que pueda inactivar al patógeno antes de su ingestión (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). En los animales, *L. monocytogenes* es capaz de

infectar a una amplia variedad de especies, entre las que se incluyen aves, crustáceos, mamíferos y peces. La enfermedad suele ser subclínica, y al igual que ocurre en el hombre, es fundamentalmente de transmisión alimentaria (Dhama y cols., 2015). La listeriosis clínica se da principalmente en los rumiantes, produciendo meningitis, romboencefalitis y aborto en las hembras gestantes, y eventualmente mastitis. De forma ocasional afecta a otras especies, y entre sus manifestaciones clínicas se incluyen también aborto, encefalitis y septicemia (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004).

Epidemiología de la listeriosis

L. monocytogenes es un patógeno zoonótico que se transmite a través de los alimentos y, como tal, posee un gran impacto socio-económico tanto en la industria alimentaria como en la Salud Pública, comprometiendo la inocuidad de los alimentos y, en último término la seguridad alimentaria, lo que le otorga relevancia dentro de la estrategia *One Health*. Se ha estimado que los costes anuales relacionados con la retirada de alimentos en la industria alimentaria, y los asociados a los costes médicos producidos por las enfermedades de origen alimentario en los Estados Unidos, alcanzan entre los 14.000 y los 152.000 millones de \$ anuales, dependiendo del número de patógenos evaluados y del criterio de valoración (Scharff, 2010, 2012; Hoffmann y cols., 2012). Entre ellos, *L. monocytogenes* es responsable de 2.800 millones de \$ anuales en pérdidas (Hoffmann y Anekwe, 2013). Más allá del coste económico, la disminución en la disponibilidad de alimentos compromete de forma significativa la seguridad alimentaria a medio y largo plazo. Los últimos datos publicados por "The World Bank" sitúan la población mundial en 7.200 millones de habitantes (data.worldbank.org), con una estimación de crecimiento que podría alcanzar los 9.150 millones en el año 2050. Con estas estimaciones, la FAO valora que habrá un aumento del 50% en la demanda de proteínas de origen animal en los próximos 10-20 años (Alexandratos y Bruinsma, 2012), por lo que los patógenos alimentarios, como *L. monocytogenes*, dificultan de forma notable la consecución del gran reto que supone la producción de alimentos para el conjunto de la población mundial.

En los últimos años, se ha detectado un aumento de la incidencia de casos de listeriosis en muchos países, sobre todo en personas mayores de 65 años (Hedberg y cols., 2006; Koch y cols., 2006; Goulet y cols., 2008; Cairns y Payne, 2009; Valero y Rafart, 2014). La listeriosis es la segunda causa de muertes relacionadas con los alimentos en los Estados Unidos (Scallan y cols., 2011). En Europa, el último informe publicado por la EFSA y el ECDC reveló una tendencia significativa en el aumento de casos en la UE durante el periodo

2008-2012, con una tasa de mortalidad del 15,6% entre los casos informados (EFSA, 2015). Esta tendencia al aumento también ha sido confirmada en España, donde un estudio reciente de 1.242 casos de listeriosis entre los años 2001 y 2007, detectó una incidencia media anual de 0,56 casos por cada 100.000 habitantes (Valero y Rafart, 2014). Sin embargo, en nuestro país la listeriosis no ha sido declarada enfermedad de declaración obligatoria hasta este año 2015 y, como consecuencia, existe poca información disponible sobre su prevalencia, y los genotipos, serotipos, fagotipos, virulencia y perfiles antimicrobianos de los aislados que están circulando en nuestro país.

L. monocytogenes está organizada, al menos, en cuatro linajes evolutivos, del I al IV, y de 13 serotipos (Doorduyn y cols., 2006; Orsi y cols., 2011). Sin embargo, la mayoría de los casos clínicos en humanos se asocian con aislados pertenecientes a los linajes I y II, pertenecientes a los serotipos 1/2b y 4b (linaje I), y al serotipo 1/2a (linaje II) (Saleh-Lakha y cols., 2013). Los estudios de caracterización genética de *L. monocytogenes* han mostrado la existencia de unos pocos clones prevalentes con distribución mundial (Chenal-Francisque y cols., 2011).

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la listeriosis se realiza mediante el cultivo positivo del agente etiológico a partir de especímenes biológicos apropiados, como sangre, líquido amniótico, fluido cerebrospinal, placenta, meconio, loquios, lavados gástricos e hisopos auriculares de recién nacidos (Allerberger y Wagner, 2009). En el caso de los animales, las muestras deben escogerse dependiendo de la forma clínica de la enfermedad: contenido del abomaso fetal, placenta y/o secreciones uterinas, en caso de aborto; bazo, hígado y/o riñones, en la forma septicémica; y fluido espinal, medula y protuberancia, en la forma encefálica (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004). Además, el patógeno se aísla de las heces y del contenido de la vesícula biliar que se considera su reservorio orgánico. Se utilizan con frecuencia sistemas de PCR para la detección rápida y específica de *Listeria* spp., *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Rodríguez-Lázaro y cols., 2004a, 2004b, 2010). La caracterización genética de los aislados se lleva a cabo mediante PFGE (Graves y Swaminathan, 2001), tipado de SNPs (Ward y cols., 2010) y MLST (Ragon y cols., 2008).

El tratamiento se lleva a cabo mediante la administración de antimicrobianos. *L. monocytogenes* es susceptible de forma natural a un amplio rango de antibióticos incluyendo aminoglucósidos, macrólidos, penicilinas, trimetoprim, tetraciclina y

vancomicina. Las recomendaciones terapéuticas incluyen penicilina o ampicilina, solas o combinadas con gentamicina, durante 4-21 días (Posfay-Barbe y Wald, 2009). Se ha descrito susceptibilidad reducida y resistencia a sulfometoxazol, cefalosporinas y quinolonas de primera generación (Troxler y cols., 2000). La resistencia a otros antimicrobianos es rara, aunque se ha encontrado una gran proporción de cepas multiresistentes en aislados animales (Srinivasan y cols., 2005).

Estrategias de prevención y control

La Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), mantiene en su página web una serie de recomendaciones generales para prevenir la listeriosis a nivel doméstico, que son similares a las de cualquier patógeno alimentario e incluyen: lavarse las manos y manipular la comida con seguridad, mantener la cocina y su instrumental limpio, cocinar los alimentos adecuadamente y almacenarlos de forma segura a temperaturas adecuadas (www.cdc.gov/listeria/prevention.html).

En la industria alimentaria, el análisis del riesgo, el cual está integrado por la evaluación de riesgos, gestión de riesgos y comunicación de riesgos, se usa frecuentemente para identificar los factores de riesgo que afectan al consumidor, y en la estimación del probable impacto de las estrategias de control (Rocourt y cols., 2003). Las estrategias de control para entornos de procesamiento de alimentos se centran principalmente en la implantación de programas de muestreo ambientales, y en dar respuesta rápida y eficaz cuando se detecta al patógeno (Tompkin y cols., 2002), mediante el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos, o APPCC. En primer lugar se identifican los peligros potenciales, tanto físicos, como químicos y biológicos, en la elaboración o procesamiento de los productos. A continuación, se identifican los Puntos de Control Crítico (PCC) en los que hay que realizar el control para lograr la seguridad del producto, y se establecen los límites críticos que marcan la diferencia entre lo que es seguro y lo que no. El siguiente paso es establecer el sistema de vigilancia de los PCC, las acciones correctivas que hay que aplicar cuando un PCC no esté bajo control, y un sistema de verificación, para confirmar que el sistema APPCC funciona correctamente. Por último hay que desarrollar un sistema de documentación para constatar que el programa APPCC está siendo seguido (Cullor, 1997).

La Comisión Europea establece en la regulación EC No 2073/2005 los criterios microbiológicos para los distintos tipos de alimentos, en los que se determina tanto el plan

de muestreo, como los límites microbiológicos y el método analítico de referencia a llevar a cabo para los principales patógenos de transmisión alimentaria. En el caso particular de *L. monocytogenes* se establece que: i) en los alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes y/o con propósitos médicos especiales, se requiere la ausencia del patógeno en 25g de muestra en el punto de venta final; ii) en los alimentos listos para el consumo que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*, y que tienen otros propósitos a los incluidos en el apartado anterior, los límites son de 100 ufc/g en el punto de venta final, y ausencia en 25g de producto cuando el control es aplicado antes de que el alimento haya abandonado las instalaciones de producción; iii) en los alimentos listos para el consumo que no permiten el crecimiento del patógeno, y que tienen otros propósitos a los incluidos en el primer punto, se permite la presencia de hasta 100 ufc/g en el punto de venta final (Commission Regulation (EC) No 2073/2005).

Debido a los elevados costes que supone la listeriosis para la industria alimentaria, y a los riesgos que conlleva para la salud humana, las diferentes agencias para la inocuidad alimentaria han implementado políticas estrictas para restringir la entrada de *L. monocytogenes* en la cadena alimentaria y, especialmente, en los productos listos para el consumo. Tras la incorporación y puesta en práctica de estas políticas, en algunos casos se ha observado una importante reducción en la incidencia de casos de listeriosis, lo que sugiere una relación entre las medidas preventivas adoptadas y la disminución de la incidencia de listeriosis en humanos (Rebagliati y cols., 2009). Sin embargo, estas estrategias que suelen ser reactivas en lugar de preventivas, normalmente se aplican a nivel local, tienen un éxito desigual, sus beneficios son a menudo transitorios y suponen un gran coste económico. En el futuro, la aplicación de programas de prevención y control eficientes pasa a través del establecimiento de nuevos niveles de colaboración, y de una comprensión holística de la problemática a través de la estrategia *One Health*, con el propósito último de asegurar el suministro de alimentos inocuos. En España, la listeriosis no ha sido declarada enfermedad de declaración obligatoria hasta este año 2015 (BOE, núm. 65, 17 de marzo de 2015, págs. 24012-24015), y como consecuencia, la aplicación de estrategias de prevención y control efectivas es complicada debido a la falta de información sobre la prevalencia y los genotipos del patógeno que están circulando en el país, así como de sus principales vías de transmisión. En este trabajo de Tesis Doctoral hemos estudiado aislados de *L. monocytogenes*, tanto clínicos como alimentarios, con el fin de abordar estas cuestiones, conocer la situación actual del problema, y ofrecer

información que permita adoptar medidas de prevención y control adecuadas por la administración competente.

1.4.3 *Francisella tularensis* y tularemia

Etiología y principales características

La tularemia es una enfermedad infecciosa causada por *Francisella tularensis*. Esta especie bacteriana es un bacilo pleomórfico no formador de esporos, Gram-negativo, anaerobio facultativo, productor de catalasa, que incluye cuatro subespecies: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *novicida* y *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, las cuales muestran marcadas diferencias en varias características epidemiológicas, incluyendo distribución geográfica, virulencia y diversidad genética (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2). *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Jellison tipo A) y *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Jellison tipo B) tienen una gran relevancia clínica. *F. tularensis* subsp. *tularensis* es la subespecie más virulenta siendo capaz de causar enfermedad potencialmente mortal. Hasta el momento, parece que su distribución está restringida a Norte América, aunque en una ocasión se detectó la presencia de un aislado en Europa (Gurycová y cols., 1998). *F. tularensis* subsp. *holarctica* causa una enfermedad menos grave y, aunque está ampliamente distribuida en el hemisferio Norte, muestra una diversidad genética escasa, lo que sugiere una emergencia reciente y dispersión geográfica rápida (Johansson y cols., 2004; Keim y cols., 2009; Vogler y cols., 2009).

La tularemia es una zoonosis que cursa con un amplio abanico de manifestaciones clínicas, dependiendo en gran medida de la ruta de infección y de la dosis infectiva. Se han descrito seis formas clínicas: ulceroganglionar, ganglionar, oculoganglionar, tifoidea, orofaríngea y neumónica (Ellis y cols., 2002). La tularemia ulceroganglionar, la más común, normalmente cursa con fiebre, dolor de cabeza y muscular, escalofríos y postración. Los pacientes presentan una úlcera en el sitio de inoculación, que puede persistir durante varios meses, y linfadenopatía con supuración en los nódulos linfáticos regionales. La tularemia ganglionar cursa con síntomas similares, pero sin úlceras. La forma oculoganglionar cursa con úlceras conjuntivales y nódulos, conjuntivitis purulenta, edema periorbital y, sin tratamiento, infarto e hipertrofia de los ganglios linfáticos cervicales y preauriculares (Bailey, 1999). La forma tifoidea de la enfermedad cursa con septicemia sin adenopatía, y normalmente aparece de forma secundaria a las formas neumónica o ulceroganglionar. La tularemia orofaríngea o gastrointestinal se adquiere tras la ingestión de agua o alimentos contaminados, y desarrolla dolor de garganta y abdominal. Dependiendo de la dosis infectiva, puede causar vómitos y diarrea y, en los casos más

graves ulceración extensa del intestino. La tularemia neumónica puede desarrollarse a consecuencia de la inhalación del patógeno, y se considera la forma más grave de la enfermedad. El cuadro clínico es variable, y los pacientes pueden desarrollar tos seca, disnea y dolor de pecho (Gill y Cunha, 1997). La enfermedad puede adquirirse con dosis infectivas bajas (10 a 50 bacterias) por inhalación, contacto directo con animales infectados, o ingestión de agua y alimentos contaminados. Este patógeno es capaz de infectar más especies animales que ningún otro microorganismo conocido (Hopla y Hopla, 1994), y es uno de los seis agentes de nivel 1 (Tier 1) seleccionados por el “Department of Health y Human Services” de los Estados Unidos por su potencial para causar efectos adversos en la Salud Pública, y gran número de víctimas en un potencial ataque bioterrorista (<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-10-05/html/2012-24389.htm>).

Epidemiología de la tularemia

F. tularensis es capaz de infectar a más de 300 especies animales, incluyendo mamíferos, aves, anfibios, insectos e invertebrados (Keim y Wagner, 2009). Algunos de estos animales, principalmente micrótidos, lagomorfos, e insectos hematófagos, juegan un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento de reservorios ambientales del patógeno, actuando como vectores y/o reservorios de la enfermedad. De hecho, los brotes de tularemia en humanos coinciden frecuentemente con brotes en animales (Morner y cols., 1993; Tarnvik y cols., 1996; Allue y cols., 2008; Luque-Larena y cols., 2015), motivo por el cual es tan importante llevar a cabo el estudio de este patógeno desde el enfoque integral de la estrategia *One Health*, evaluando de forma conjunta su presencia en el hombre, en los animales y en los potenciales reservorios ambientales.

En la última década, muchos países distribuidos en los cinco continentes han informado de la emergencia o reemergencia de *F. tularensis*, y parece que está más ampliamente distribuido que lo que se pensaba (Figura 4). En España, la tularemia fue detectada por primera vez en 1997, causando uno de los mayores brotes jamás descritos en humanos (De Mateo y cols., 1998). En total se describieron 559 casos entre junio de 1997 y abril de 1998 en 10 provincias, localizadas fundamentalmente en Castilla y León. El brote fue asociado a la caza y manipulación de liebres (*Lepus europaeus*), y las formas clínicas más comunes fueron la ulceroganglionar (55,4%), ganglionar (15,3%) y tifoidea (6,6%). Las características bioquímicas y genómicas de los aislados recuperados de este primer brote fueron estudiadas por el grupo de investigación de los Profesores Elías F. Rodríguez Ferri y Cesar B. Gutiérrez Martín, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León (García

del Blanco y cols., 2002, 2004). Además, un estudio que integró aislados de *F. tularensis* subsp. *holarctica* de varios países de Europa, identificó una deleción genómica de 1,59 kpb específica de los aislados de España y Francia (Dempsey y cols., 2007).

En el periodo 2007-2008 tuvo lugar un segundo gran brote de tularemia en humanos en la misma área geográfica, afectando a 507 personas, pero en un contexto epidemiológico diferente. En este caso, el comienzo de la epidemia coincidió con un pico en la población del topillo campesino (*Microtus arvalis*) y también con abundantes casos en liebres, y las formas clínicas más frecuentes fueron la tifoidea y neumónica (65% de los casos), consistente con el hecho de que la infección fue adquirida por vía inhalatoria (Avery y Barnett, 1967; Allue y cols., 2008). Además, entre ambas epidemias tuvo lugar un pequeño brote de tularemia en otra región de España en el 2001 (Anda y cols., 2001).

Resulta evidente, por tanto, la necesidad de estudiar esta enfermedad desde una aproximación holística en el marco de la estrategia *One Health*, con el propósito de determinar los factores bióticos y abióticos que están contribuyendo al establecimiento de focos naturales del patógeno en las áreas endémicas, ya que solo de esta manera se podrán articular programas de prevención y control efectivos. Estos estudios suponen un reto, ya que los factores que influyen en la persistencia del patógeno en las distintas áreas endémicas varían. Así, mientras que los mosquitos parecen ser el principal vector en Suecia (Lundström y cols., 2011; Thelaus y cols., 2014; Backman y cols., 2015), un estudio reciente ha demostrado que el 48% de los casos de tularemia que tuvieron lugar en Nebraska, entre los años 1998 y 2012, estuvieron asociados a la exposición a gatos domésticos (Larson y cols., 2014), y en Castilla y León parece que este papel lo juegan la liebre común (*Lepus europaeus*) y el topillo campesino (*Microtus arvalis*). Consecuentemente, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han estudiado de forma conjunta los aislados humanos y animales causantes de los brotes de tularemia en Castilla y León en 1997 y 2007, a través de la colaboración con instituciones del ámbito de la Salud Pública y Sanidad Animal en la región: el Hospital Clínico de Valladolid, el CAULE, el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Castilla y León y la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León.



Figura 4. Distribución mundial de la tularemia

Diagnóstico y tratamiento

La tularemia puede ser difícil de diagnosticar debido a que, por un lado, no es una enfermedad frecuente, y por otro, los pacientes que la padecen pueden presentar un abanico de signos clínicos, dependiendo principalmente de la ruta de entrada del patógeno y de la dosis infectiva, lo que fácilmente puede llevar a error. El diagnóstico puede ser llevado a cabo mediante el aislamiento por cultivo microbiológico del agente etiológico, serología y técnicas de detección molecular. El diagnóstico es confirmado tras el crecimiento e identificación de *F. tularensis* en cultivo. La detección del patógeno se lleva a cabo en diferentes muestras biológicas dependiendo de la forma clínica de la enfermedad: hisopos de lesiones visibles, aspirados de ganglios linfáticos o biopsias, lavados faríngeos, muestras de esputo, e incluso aspirados gástricos; sin embargo, el aislamiento a partir de sangre no es frecuente.

F. tularensis es un patógeno que requiere para crecer de medios de cultivo enriquecidos con cisteína, como agar chocolate enriquecido, agar corazón cisteína con 9% de sangre de agar chocolate (CHAB, por su acrónimo en inglés), agar de carbón tamponado y extracto de levadura, o agar Thayer-Martin modificado. Las directrices de la OMS para la tularemia recomiendan el cultivo en medio CHAB, ya que *F. tularensis* presenta un crecimiento característico que permite la identificación presuntiva del patógeno (WHO guidelines on Tularemia, 2007). La prueba de microaglutinación es el método serológico estándar para la detección de anticuerpos frente a *F. tularensis* (Brown y cols., 1980), y

también se han desarrollado varias pruebas ELISA (Schmitt et al., 2005; Rastawicki y Wolaniuk, 2013). La detección molecular del patógeno puede llevarse a cabo mediante varios sistemas de PCR convencional y a tiempo real que han sido diseñados para este propósito (Johansson y cols., 2000; Versage y cols., 2003; Kugeler y cols., 2006). Esta metodología posee la ventaja de ser más rápida, sensible, y específica que la serología, y además es laboralmente segura, ya que no requiere del cultivo y manipulación directa del patógeno vivo.

La caracterización genética de *F. tularensis* supone un reto, ya que los estudios que se han llevado a cabo hasta el momento demuestran que *F. tularensis*, y en especial la subsp. *holarctica*, presentan una diversidad genética muy escasa a pesar de estar ampliamente distribuidos en el hemisferio Norte (Johansson y cols., 2004; Farlow y cols., 2005; Vogler y cols., 2009; Gyuranecz y cols., 2012). Se ha planteado la hipótesis de que se debe a la existencia reciente de un cuello de botella o un evento de expansión clonal que ha reducido drásticamente su diversidad genética (Larsson y cols., 2007; Vogler y cols., 2009). Como la técnica de PFGE no ofrece suficiente resolución genética (García del Blanco y cols., 2002), en los últimos años se han desarrollado otra serie de técnicas de alta resolución que miden la variación en *loci* genéticos con alta variabilidad: el análisis multi-locus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA) (Johansson y cols., 2004; Svensson y cols., 2009a), los polimorfismos de un solo nucleótido canónicos (canSNPs) (Karlsson y cols. 2013), las inserciones y deleciones (indels) (Svensson y cols., 2009; Karlsson y cols., 2013), y la genómica comparada mediante la secuenciación del genoma completo (WGS) (Birdsell y cols., 2014).

Como en la mayoría de las infecciones bacterianas, el tratamiento se realiza mediante la administración de antimicrobianos. En los casos más graves se utilizan los aminoglucósidos (estreptomicina y gentamicina), mientras que en los más leves, se administra ciprofloxacina por vía oral o doxiciclina (Enderlin, 1994). Los antibióticos del grupo de los β -lactámicos no afectan al patógeno, y se ha observado resistencia a eritromicina en aislados de Europa, aunque, hasta el momento, no en los procedentes de Norte América (Ikaheimo y cols., 2000). Los resultados de un estudio de respuesta terapéutica llevado a cabo en 142 pacientes del primer brote de tularemia en Castilla y León, mostraron que la ciprofloxacina fue el antibiótico con el menor porcentaje de fallos terapéuticos y menos efectos secundarios, por lo que por el momento se recomienda su uso preferente en esta región (Pérez-Castrillon y cols., 2001).

Estrategias de prevención y control

1

El mayor riesgo de adquisición de tularemia en las zonas endémicas es la exposición al medio ambiente, a través de actividades al aire libre que supongan el contacto directo o indirecto con fuentes de infección, como la caza, jardinería, agricultura, o la práctica de deportes. Por tanto, para prevenir la tularemia es importante evitar el contacto directo con cadáveres de animales muertos por causa desconocida, protegerse frente a las picaduras de insectos, principalmente garrapatas y mosquitos que actúan como vectores del patógeno, utilizar guantes y mascarillas en la manipulación de piezas de caza, y cocinar estas últimas adecuadamente. El control y prevención de la tularemia supone un gran reto, ya que existen muchos factores, tanto bióticos como abióticos, que están involucrados en el establecimiento de los focos naturales de *F. tularensis* en las áreas endémicas. Además, a día de hoy no se comercializa una vacuna contra la tularemia con destino al ser humano y tampoco en los animales, a pesar de que se ha demostrado la protección inmunológica mediante la cepa viva atenuada (LVS) (Saslaw y cols., 1961a, 1961b), que sí se ha utilizado en la antigua Unión Soviética, mientras que en Occidente solo se autoriza su uso en ensayos clínicos, ya que la base de la atenuación de la cepa LVS no se conoce bien, y la respuesta inmune inducida tampoco está bien caracterizada (Ellis y cols., 2002). En consecuencia, la única manera de establecer programas de prevención y control efectivos es a través del marco de la estrategia *One Health*, estudiando de forma conjunta los aislados de origen humano, animal y ambiental, con el fin de determinar que especies animales y factores ambientales pueden estar actuando como vectores y/o reservorios en cada región en particular. Por este motivo, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos estudiado las características genéticas de los aislados de *F. tularensis* que fueron responsables de los brotes en los años 1997 y 2007, tanto en humanos como en animales, con el fin de tratar de identificar los principales reservorios de la enfermedad en Castilla y León y poder recomendar la práctica de medidas de prevención y control apropiadas.

Capítulo 2

Ámbito de aplicación de esta Tesis

2.1 Objetivos

El grado de globalización que ha alcanzado el mundo en el siglo XX, y la existencia de problemáticas globales de gran complejidad, en las que intervienen multitud de factores de diversa índole, como biológicos, económicos, medio-ambientales, políticos y sociales, han contribuido al resurgimiento internacional del concepto *One Health* como estrategia para abordar la Salud desde una aproximación holística y multidisciplinar. En este trabajo doctoral, se han estudiado cuatro patógenos que tienen gran impacto socio-económico en Castilla y León en el marco de la estrategia *One Health*, mediante la colaboración interdisciplinar entre nuestro instituto de investigación, el ITACyL, la administración, y profesionales e instituciones con ámbito de trabajo tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal.

En este contexto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar desde una aproximación holística la situación actual (prevalencia, distribución, diversidad genética y epidemiología molecular) de algunos de los principales patógenos emergentes con relevancia para el sector ganadero, la industria alimentaria, la Salud Pública y la Sanidad Animal en Castilla y León, con el fin de generar información que permita el diseño y aplicación de programas de prevención y control efectivos, que permitan limitar su impacto socio-económico en nuestra Comunidad Autónoma.

2.2 Esquema de presentación de la memoria de Tesis Doctoral

La memoria está organizada en seis capítulos:

Capítulo 1: incluye la introducción general, poniendo de manifiesto la importancia que tiene la implantación de la estrategia *One Health* para la resolución de problemáticas complejas y globales, y la justificación de su aplicación al estudio de patógenos con interés para el sector ganadero, la industria alimentaria, la Salud Pública y la Sanidad Animal en España, y en particular en Castilla y León.

Capítulo 2: expone el objetivo de esta Tesis, así como su esquema de presentación.

Capítulo 3: contiene nueve artículos publicados que se corresponden con los resultados de este trabajo, divididos en cuatro secciones dependiendo de su importancia dentro del

ámbito de la seguridad alimentaria, la resistencia a los antibióticos, la inocuidad alimentaria y los riesgos biológicos:

Sección 3.1 *Mycoplasma agalactiae* en el marco de la seguridad alimentaria.

Sección 3.2 *Staphylococcus aureus* con resistencia a meticilina en el marco de la emergencia de microorganismos con resistencia a los antibióticos.

Sección 3.3 *Listeria monocytogenes* en el marco de la inocuidad alimentaria.

Sección 3.4 *Francisella tularensis* como riesgo biológico.

Capítulo 4: incluye la discusión general, poniendo en contexto los resultados obtenidos, evaluando su contribución al cuerpo de conocimiento científico y su potencial aplicación para articular programas de prevención y control por parte de las autoridades competentes.

Capítulo 5: enumera las 13 conclusiones que se extraen de este trabajo.

Capítulo 6: contiene 279 referencias académicas citadas en los capítulos de introducción y discusión general, ordenadas alfabéticamente.

Capítulo 3

Resultados

A microscopic image showing several Mycoplasma agalactiae cells. The central cell is large and roughly spherical, with a granular, brownish-yellow interior and a distinct, darker central region. It is surrounded by other smaller, similar cells, some of which are partially visible at the top left and bottom right. The background is a dark, textured blue-grey color.

*Mycoplasma
agalactiae*

Sección 3.1

Sección 3.1.1

A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain

Jaime Ariza-Miguel, David Rodríguez-Lázaro y Marta Hernández

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, C.P. 47071 Valladolid, Spain

Publicado en *BMC Veterinary Research*. 2012. Vol. 8, 1



A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain

Ariza-Miguel *et al.*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain

Jaime Ariza-Miguel, David Rodríguez-Lázaro* and Marta Hernández*

Abstract

Background: Contagious Agalactia (CA) is one of the major animal health problems in small ruminants because of its economic significance. Currently, four *Mycoplasma* spp. have been associated with this syndrome: *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. putrefaciens*. Their presence has been evaluated in several studies conducted in CA-endemic countries. However, previous Spanish studies have been focused on caprine CA, and there is a knowledge gap regarding which *Mycoplasma* species are present in sheep flocks from Spain, which has the second highest number of sheep amongst the 27 European Union member states. Consequently, we investigated the presence and geographic distribution of the four CA-causing mycoplasmas in Spanish dairy sheep farms. This is the first time such an investigation has been performed.

Results: Three hundred thirty nine out of 922 sheep flocks were positive for *M. agalactiae* by real time PCR (36.8%) and 85 by microbiological identification (9.2%). Interestingly, all 597 milk samples assessed for the presence of *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. putrefaciens* tested negative. To evaluate the intermittent excretion of the pathogen in milk, we sampled 391 additional farms from 2 to 5 times, resulting that in 26.3% of the cases a previously positive farm tested negative in a later sampling.

Conclusions: *M. agalactiae* was the only *Mycoplasma* species detected in the study area showing a high frequency of presence and wide distribution. Therefore, the establishment of a permanent surveillance network is advantageous, as well as the implementation of control and prevention measures to hinder the dissemination of *M. agalactiae* and to prevent the entrance of other *Mycoplasma* species.

Keywords: *Mycoplasma agalactiae*, Contagious agalactia, Real time PCR, Sheep, Dairy, Spain

Background

Contagious Agalactia (CA) is, along with bovine pleuropneumonia and contagious caprine pleuropneumonia, one of the three *Mycoplasma*-induced diseases affecting small ruminants which are notifiable to the World Organisation for Animal Health due to their economic significance [1]. CA is a syndrome clinically characterized by mastitis, arthritis, keratoconjunctivitis and occasionally abortion [2,3] and *Mycoplasma agalactiae* is considered its major etiological agent. *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. putrefaciens* cause a clinically similar syndrome, particularly in goats [4,5]. The syndrome causes major economic losses because of reduction or suppression of milk production,

abortion, high morbidity and mortality rates, and costs associated with the diagnosis, treatment and prevention which are estimated to be above 20 million Euros per year in the European countries forming the Mediterranean Basin [3,4,6].

CA has its major impact in the Mediterranean countries, where the disease is considered to be endemic. However, it is also widely distributed in west Asian countries, central, north and east African Countries, the USA, and Brazil [1,2,7-9]. Interestingly, the significance of the different *Mycoplasma* species causing CA varies depending on the geographic area. In the United States, *M. mycoides* subsp. *capri* is the most prevalent caprine *Mycoplasma*, although *M. agalactiae* has been recently isolated [9]. In Northern Jordan, *M. agalactiae* and *M. mycoides* subsp. *capri* play the major role in both, sheep and goats [7,10]. In France, *M. agalactiae* has reemerged in sheep flocks located in the basin of the Western

* Correspondence: ita-rodriguez@itacyl.es; ita-herpema@itacyl.es
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL), Consejería de Agricultura y Ganadería, Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, C.P. 47071, Valladolid, Spain

Pyrénées, causing 98 new outbreaks in 2008 [1]. In Spain, which has the second highest number of sheep amongst the 27 European Union member states, research has been focused on caprine CA, and there is a knowledge gap regarding which *Mycoplasma* species are present in sheep flocks from that country.

Consequently, in the present study we aimed to assess for the first time the presence and geographic distribution of the four *Mycoplasma* species causing CA, by analyzing raw milk samples from Spanish dairy sheep farms by classical microbiological methods, and PCR-based methods which have been demonstrated to be specific and sensitive [11-13]. The knowledge acquired will allow the implementation of appropriate control programs for those pathogens.

Results

Sensitivity of the PCR-based methods and capability to detect coinfecting samples

Artificially contaminated milk samples (50 mL) inoculated with from 10^8 cells to 10^2 cells of each *Mycoplasma* gave positive results by the three PCR-based systems [11-13]. Detection failed in the milk samples seeded with 10^1 cells (0.2 cells/mL). Capability to detect samples coinfecting with various CA-causing mycoplasmas was demonstrated in samples artificially contaminated with the 4 *Mycoplasma* species analyzed in this study.

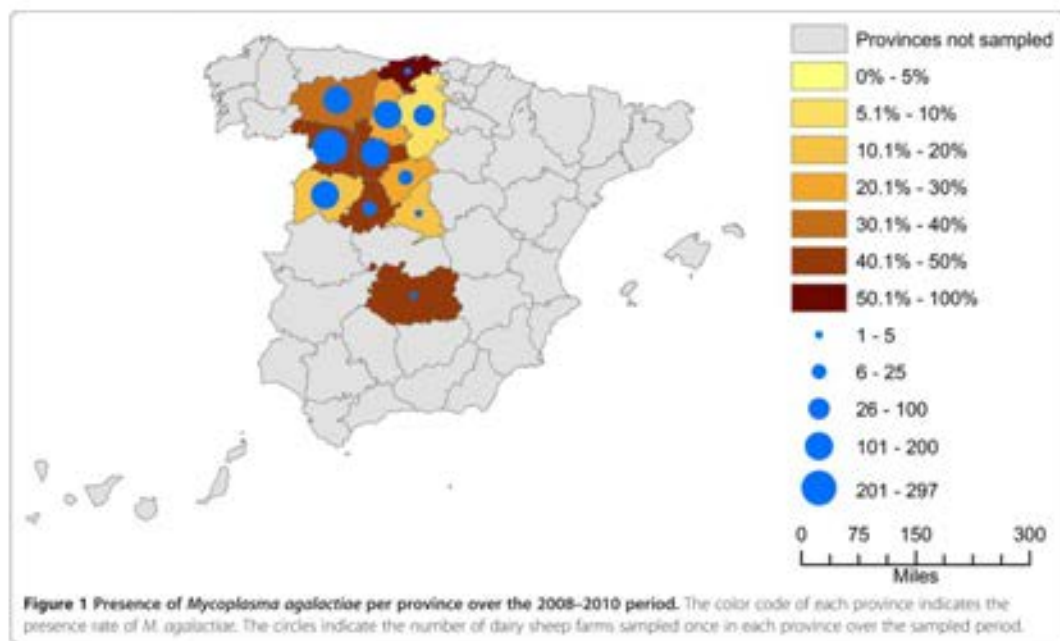
Detection of CA-causing mycoplasmas in Spanish sheep farms

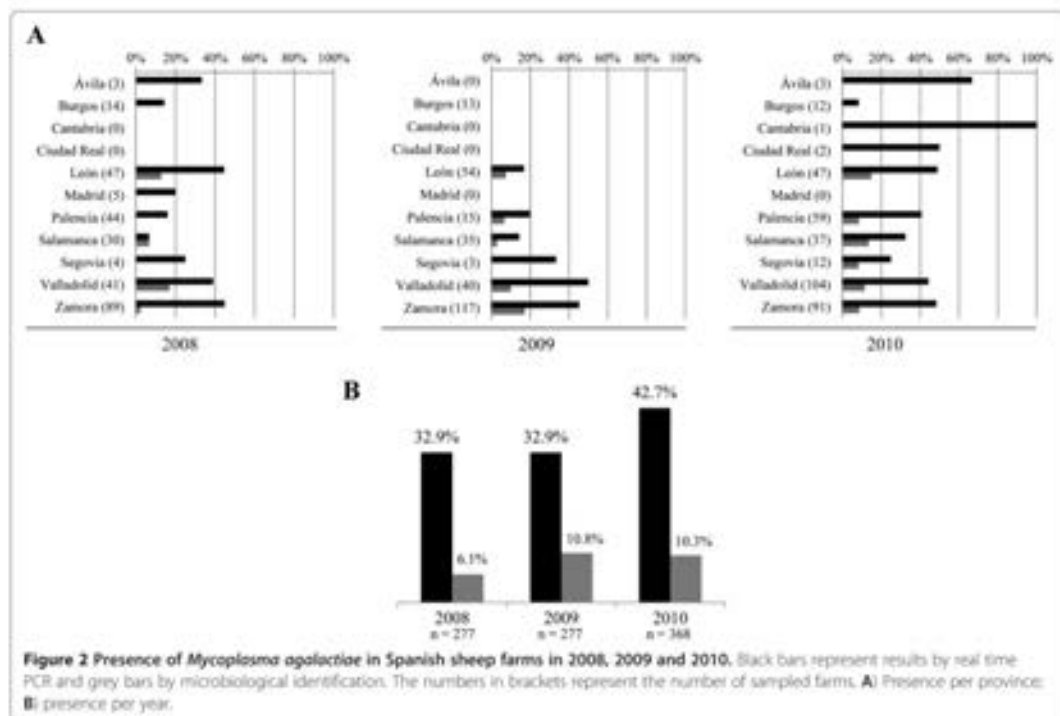
All 597 milk samples tested negative for *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. putrefaciens*. On the other hand, 339 out of 922 dairy sheep farms were positive for *M. agalactiae* by real time PCR (36.8%). Furthermore, the pathogen was observed by microscopy identification in samples collected from 85 flocks (9.2%). Thereby, 411 *M. agalactiae* isolates were obtained.

We assessed the level of intermittent excretion of *M. agalactiae* during the sampling period using data obtained from other additional 391 farms sampled repeatedly from 2 to 5 times. In 26.3% of the cases a previously positive farm resulted negative in a later sampling and conversely, 38 farms (9.7%) tested negative in the first sampling but resulted positive in any of the subsequent samplings. Overall, 250 of those sheep farms (63.9%) were positive for *M. agalactiae*.

Geographic distribution of flocks infected with *Mycoplasma agalactiae*

Positive farms for *M. agalactiae* were located in all eleven provinces sampled (Figures 1, 2A). The frequency ranged from 7.7% to 100% of the flocks sampled per province revealing that the microorganism is widely distributed.





Temporal distribution of *Mycoplasma agalactiae*

The presence of *M. agalactiae* increased between 2008 (32.9%) and 2010 (42.7%) (Figure 2B). The minimum and maximum frequency of detection of *M. agalactiae* ranged from 7.7% in February 2009 to 53.1% in May 2009. The months when the pathogen was most frequently detected were May 2009 (53.1%), July 2010 (51%) and October 2008 (50%). On the contrary, the lowest detection occurred in February 2009 (7.7%), June 2009 (14%) and April 2010 (16.7%). Thereby, 72 out of 194 farms (37.1%) were positive to *M. agalactiae* in Spring (i.e. farms analyzed in March, April and May), 113 out of 286 (39.5%) in Summer (i.e. June, July and August), 110 out of 280 (39.3%) in Autumn (i.e. September, October and November) and 44 out of 162 (27.2%) in Winter (i.e. December, January and February).

Discussion

M. agalactiae was the only CA-causing *Mycoplasma* detected in dairy sheep farms located in the study area, and it was found to be widely distributed as it was detected in all eleven provinces sampled (Figure 1). In contrast, although *M. agalactiae* has been detected with a high prevalence in Spanish goat herds ranging from 40% to 66% [14,15], it seems that *M. mycoides* subsp.

capri plays the major role in goat [2,16]. Interestingly, *M. capricolium* subsp. *capricolium* and *M. putrefaciens* have been recently isolated in goat herds located in the Canary Islands and Extremadura (southwestern Spain) regions [17,18], and yet those pathogens have not been detected in sheep flocks from the study area suggesting that Spanish dairy sheep are free of their presence or, at least, that their distribution would be restricted outside the sampling area. Furthermore, in this study we have observed that the frequency of detection of *M. agalactiae* increased from 32.9% in 2008 to 42.7% in 2010, suggesting that the pathogen has spread in the sampling area during the study period. On the other hand, we tried to establish relationships between the excretion of the microorganism in milk and the stages in sheep milk production (e.g. period of parturitions, the start of lactation) by analyzing the presence of *M. agalactiae* per month and per season in the different sampling years, but no pattern was found. We hypothesize that this is because the farms from the sampled region frequently had different production systems, and the same production stage may have occurred in a different time between farms.

To our knowledge, few surveys have been carried out internationally to determine which *Mycoplasma* species

are circulating in sheep. In Northern Jordan, investigations revealed a seroprevalence in sheep, goat and mixed flocks of 25%, 21% and 30% respectively, for *M. agalactiae*, and 32%, 38% and 34% for *M. mycoides* subsp. *capri*, suggesting that both microorganisms are widely distributed in that country and to the same extent in sheep and goats [7,10]. This scenario is probably caused because in Jordan more than 93% of sheep and goats are kept together in mixed farms, so both hosts are exposed to the same pathogens. In contrast, the existence of mixed farms in Spain is not common, hindering the dissemination of other *Mycoplasma* species from goat herds to sheep flocks.

Detection of *M. agalactiae* by using microbiological techniques (9.2%) greatly underestimated its presence in comparison to detection by using real time PCR (36.8%). This finding prompts the recommendation that PCR-based methods should be routinely used in *Mycoplasma* detection, as microbiological identification leads to underestimation due to the fastidious growth requirements of mycoplasmas, and serology is not a suitable method in those areas, such as Spain, where systematic vaccination is extended.

The results of this study require careful interpretation. Firstly, this syndrome follows a chronic course in endemic areas and the animals present an intermittent excretion of the microorganism in milk [3,5]. Therefore, the presence of *M. agalactiae* could have been underestimated, as samples were collected from the milk tanks. In fact, the findings obtained in this study suggest a high level of intermittent excretion, as in more than 26% of the re-sampled farms a previously positive flock tested negative in a later sampling and 63.9% overall tested positive. Considering that *M. agalactiae* is a highly persistent pathogen, remaining in the animals for years [4,5], and that it is very difficult to eliminate from infected herds, we can assume that in most of those cases infected animals were not excreting the pathogen at the sampling time or that the number of bacteria present was below the limit of detection. Consequently, if monitoring of a herd needs to be implemented, the inclusion of other suitable type of samples (e.g. blood, articular, auricular, ear canal, eye and vaginal swabs, nasal secretions, joint fluids) is strongly recommended. Secondly, the lower sensitivity of the conventional-PCR technique in comparison to the real time PCR could have underestimated the presence of the *Mycoplasma* species detected by the first method. Notwithstanding, all CA-causing mycoplasmas were detected after the inoculation of from 10^8 to 10^7 cells of each *Mycoplasma* spp. in 50 mL milk samples. Detection failed in samples containing 10^1 cells (0.2 cells/mL) probably because the initial amount of mycoplasmas was not enough to compete during the enrichment step with all the other microbiota present in the milk samples. This suggests

that all the PCR systems can detect the minimum quantity of mycoplasmas needed for growing in the enrichment step, and therefore that the presence of the *Mycoplasma* species as detected by conventional PCR would not be underestimated in detriment of the species detected by real time PCR. In addition, these results confirm that the enrichment step does not favor any species to the detriment to the others, and therefore that we can detect co-infected samples.

Conclusions

This study provides for the first time an overview of the presence of CA-causing mycoplasmas circulating in Spanish dairy sheep farms. *M. agalactiae* was the only species detected in the study area showing a high frequency of presence, and it was found to be widely distributed. The high frequency of detection of the pathogen supports the implementation of control and prevention measures to hinder the dissemination of *M. agalactiae* and to prevent the entrance of other *Mycoplasma* species, such as systematic laboratory detection, isolation or slaughtering of infected flocks and tracing of livestock exchange.

Methods

Study area and sampling

From August 2008 to July 2009, and from April to December 2010, 1,798 samples were taken from 1,313 dairy sheep farms located in twelve provinces: Ávila, Burgos, Cáceres, Cantabria, Ciudad Real, León, Madrid, Palencia, Salamanca, Segovia, Valladolid and Zamora. Most provinces belong to the Spanish region which presents the highest sheep milk production (60% of total sheep milk) [19]. Selection of the farms was not performed following a formal randomization process, but blind samples were randomly provided by the Regional Interprofessional Dairy Laboratory. As blind sampling was carried out, 922 out of 1,313 farms were sampled once, and the resting 391 farms were sampled from 2 to 5 times. To ensure that no farms contribute more than once in the determination of the frequency of presence of the mycoplasmas, only those results obtained from the 922 farms sampled once have been used to perform the analyses showed in this study. The results obtained from the farms sampled several times have been only used to assess the level of intermittent excretion of the microorganisms in milk.

The sampling represents more than 16% of total dairy sheep farms in Spain and more than 44% of the farms located in the most productive region (Table 1). Location of the farms and overall number of dairy sheep per province is depicted in Figure 3. Each week, twenty raw milk samples of 50 ml were taken from the refrigerated tanks

Table 1 Geographic distribution of the Spanish dairy sheep farms sampled to detect CA-causing mycoplasmas

Province	No. Farms	No. Sampled Farms	% Sampled Farms
Ávila	91	9	9.9
Burgos	125	65	52.0
Cáceres	130	2	1.5
Cantabria	29	2	6.9
Ciudad Real	829	2	0.2
León	430	205	47.7
Madrid	174	6	3.4
Palencia	414	177	42.8
Salamanca	384	132	34.4
Segovia	79	30	38.0
Valladolid	491	292	59.5
Zamora	502	391	43.3
12 provinces	4,078	1,313	32.2

Study areas for detecting the presence of CA-causing mycoplasmas in Spanish dairy sheep farms. The samples were collected from flocks located in twelve provinces showing highest sheep milk production in Spain.

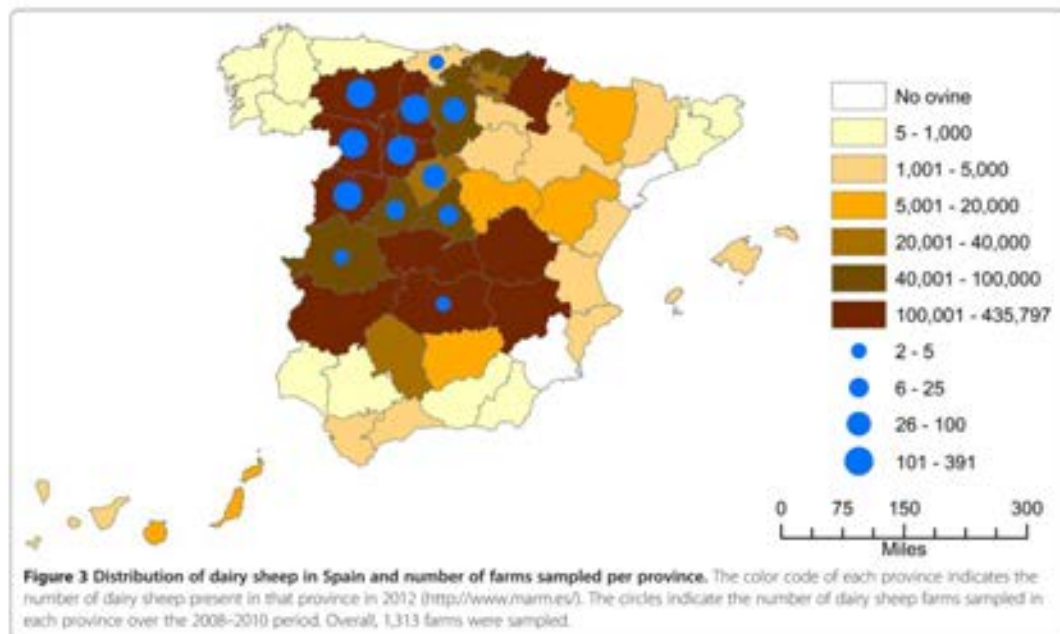
and preserved during transportation at 4°C with 133 µL of a bacteriostatic agent (9.975×10^{-2} µg chloramphenicol, 2.394 µg sodium azide, 1.33 µL ethanol, 5.985 µg trisodium citrate hydrate, 4.655×10^{-3} µg bromophenol blue). The samples were immediately analyzed because freezing considerably reduces the viability of mycoplasmas [20].

Culture of milk samples and DNA extraction

One hundred microlitres of the milk samples were cultivated in 9.9 ml of Mycoplasma broth base with Mycoplasma supplement G (Oxoid, Hampshire, UK), at 37°C in 5% CO₂ atmosphere for 3 days. For DNA extraction, 1 ml of culture was centrifuged at 13,000 × g for 15 min, and the cell pellet was resuspended in 100 µL of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) for further incubation at 95°C with shaking for 20 min. Then, samples were centrifuged at maximum speed for 3 min, the supernatant was transferred into new tubes, and subsequently analyzed for CA-causing mycoplasmas.

Molecular detection of CA-causing mycoplasmas by PCR-based methods

Since *M. agalactiae* is the main aetiological agent, its presence was assessed in all farms. The presence of *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* and *M. putrefaciens* was evaluated in 597 samples taken from 528 sheep farms distributed in the eleven provinces. The latter samples were collected in July 2009 and since April to December 2010. Molecular detection of *M. agalactiae* was conducted by real time PCR as previously described [11] in a 7500 real time PCR system platform (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). *M. mycoides* cluster and *M. putrefaciens* detection was carried out by conventional PCR [12,13]. PCR amplification products were resolved by gel electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels and visualized after staining with



ethidium bromide by using a UV transilluminator (BioRad, Hercules, CA, USA). All samples were analyzed in duplicate and positive, negative extraction and non template controls were included in each run. The limit of detection of the real time PCR system corresponds to approximately 1 genomic equivalent per reaction. Those of the conventional PCR systems have not been reported. Therefore, in order to demonstrate that the PCR methods used in this study could detect the same levels of *Mycoplasma* contamination, and that detection of naturally co-infected samples would be possible, raw milk samples were artificially contaminated with decreasing concentrations of all four mycoplasmas and then processed following the protocol detailed above.

Microbiological detection

Pre-enriched milk samples were cultured in agar plates of the selective medium, which were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 3 to 4 days. After incubation, colonies consistent with *Mycoplasma* phenotype were identified using an optical microscope Leica DMLS under 100× magnifications (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Isolation of mycoplasmas

We isolated from 1 to 6 colonies from each positive milk sample and subculture them in specific broth medium at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere for 3 days. The nature of the isolates was reconfirmed by real time PCR [11] and the purity of the culture by checking the morphology of the colonies on agar plates of the selective medium. Finally, the isolates were cryopreserved in glycerol (16% v/v) and stored at -80°C.

Abbreviations

CA, Contagious Agalactia.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JA carried out the experiments, results analysis and drafted the manuscript. DR, and MH led the project, designed the study and revised the results and manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by project RTA 2008-073 of the Spanish Ministry of Education and Science, Government of Spain. We thank Dr. Nigel Cook (ERA, UK) for critical revision of the manuscript.

Received: 3 July 2012 Accepted: 10 September 2012

Published: 24 September 2012

References

1. Chazel M, Tardy F, Le Grand D, Calavas D, Pournarat F: Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet Res* 2000, 6:32.
2. De la Fe C, Assunção P, Antunes T, Rosales RS, Poveda JB: Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *Vet J* 2005, 170(2):257-259.

3. Lambert M: Contagious agalactia of sheep and goats. *Rev Sci Tech* 1987, 6(3):699-711.
4. Bergeron D, Berthelot X, Pournarat F: Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev Sci Tech* 1997, 16(3):848-873.
5. Corrales JC, Eshal A, De la Fe C, Sánchez A, Assunção P, Poveda JB, Contreras A: Contagious agalactia in small ruminants. *Small Rumin Res* 2007, 68(1):154-166.
6. Nicholas RAJ: Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin Res* 2002, 45:145-149.
7. Al-Momani W, Abo-Shehadeh MN, Nicholas RAJ: Seroprevalence of and risk factors for *Mycoplasma mycoides* subspecies capri infection in small ruminants in Northern Jordan. *Trop Anim Health Prod* 2011, 43(2):463-469.
8. De Azevedo ED, De Alcantara NDB, Do Nascimento EP, Tabosa IM, Barreto ML, De Almeida JF, Araújo MD, Rodrigues APD, Riet-Correa F, De Castro RS: Contagious Agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz J Microbiol* 2006, 37(4):576-581.
9. Kinde H, DaMassa AJ, Wakenell PS, Petty R: *Mycoplasma* infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). *J Vet Diagn Invest* 1994, 6(4):423-427.
10. Al-Momani W, Nicholas RAJ, Abo-Shehadeh MN: Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Rev Vet Med* 2008, 83:1-10.
11. Oravcová K, López-Enríquez L, Rodríguez-Lázaro D, Hernández M: *Mycoplasma agalactiae* p40 Gene, a novel marker for diagnosis of Contagious Agalactia in sheep by Real-Time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J Clin Microbiol* 2009, 47(2):445-450.
12. Peyraud A, Woubit S, Poveda JB, De la Fe C, Mercier P, Thiaucourt F: A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome in goats. *Mol Cell Probes* 2003, 17(6):289-294.
13. Woubit S, Manso-Silván L, Lorenzon S, Gauhaud P, Pournarat F, Pellet M-P, Singh VP, Thiaucourt F: A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: Application to the diagnosis of contagious agalactia. *Mol Cell Probes* 2007, 21(5-6):391-399.
14. Andrade M, Déniz S, González M, Rodríguez F, Poveda JB: Epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC in caprine herds by indirect ELISA in Gran Canaria: preliminary results. In *COIF 626: Agriculture and Biotechnology. Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnosis*. Edited by Poveda J, Fernandez A, Frey J, Johansson KE, Brussels: Epidemiology and Molecular Genetics, vol.5. European Communities, 2000:126-129.
15. Assunção P, De la Fe C, Ramirez AS, Andrade M, Poveda JB: Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. *Vet Rec* 2004, 154(6):684-687.
16. Amores J, Gómez-Martín A, Corrales JC, Sánchez A, Contreras A, De la Fe C: Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. *Theriogenology* 2011, 75(7):1268-1270.
17. De la Fe C, Gutiérrez A, Poveda JB, Assunção P, Ramirez AS, Fabelo F: First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, one of the causal agents of caprine contagious agalactia, on the island of Lanzarote (Spain). *Vet J* 2007, 173(2):440-442.
18. Gil MC, Peña FJ, Hermsoso De Mendosa J, Gomez L: Genital Lesions in an Outbreak of Caprine Contagious Agalactia Caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J Vet Med* 2003, 50(10):484-487.
19. The Spanish Ministry of Agriculture: Food and Environment (MARM) database [http://www.marm.es/app/ocwaw/inicio.aspx?sec=500].
20. Amores J, Sánchez A, Martín AG, Corrales JC, Contreras A, De La Fe C: Viability of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat milk samples stored under different conditions. *Vet Microbiol* 2010, 145(3-4):347-350.

doi:10.1186/1746-6148-8-171

Cite this article as: Ariza-Miguel et al.: A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. *BMC Veterinary Research* 2012 8:171.

Sección 3.1.2

Molecular Characterization of *Mycoplasma agalactiae* Reveals the Presence of an Endemic Clone in Spain

Jaime Ariza-Miguel, David Rodríguez-Lázaro y Marta Hernández

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, C.P. 47071 Valladolid, Spain

Publicado en *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. Vol. 51, 656-660

Molecular Characterization of *Mycoplasma agalactiae* Reveals the Presence of an Endemic Clone in Spain

Jaime Ariza-Miguel, David Rodríguez-Lázaro, Marta Hernández

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL), Consejería de Agricultura y Ganadería, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain

Mycoplasma agalactiae isolates from Spain were genetically characterized to investigate their genomic diversity and to better understand their relationship to isolates from other countries. Molecular typing revealed a high genomic homogeneity in Spanish *M. agalactiae* isolates, which clearly shows the circulation of one endemic clonal population.

Mycoplasma agalactiae is the main etiologic agent of contagious agalactia (CA), a serious syndrome affecting small ruminants; the World Organization for Animal Health must be notified of its occurrence because of its high economic significance worldwide. The first genomic studies showed little genomic diversity within *M. agalactiae* species, apart from that provided by antigenic variation (1, 2). Recently, the development of new sequence-based typing systems has revealed more genetic heterogeneity than previously thought (3–5). To investigate the genomic diversity of Spanish *M. agalactiae* isolates and to elucidate their relationship to those from other geographic areas, we analyzed isolates from Spain using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), which has been demonstrated to be robust and discriminative for typing different species of mycoplasmas (6–9), includ-

ing *M. agalactiae* (5, 10); we also used the most recently developed sequence-based typing techniques, such as multilocus variable-

Received 23 October 2012; Returned for modification 17 November 2012

Accepted 1 December 2012

Published ahead of print 5 December 2012

Address correspondence to David Rodríguez-Lázaro, larodan@itacyl.es, or Marta Hernández, hermema@itacyl.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02835-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
[doi:10.1128/JCM.02835-12](http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02835-12)

TABLE 1 MLST results at 5 housekeeping loci obtained with a subset of 48 Spanish *Mycoplasma agalactiae* field isolates and strains PG2 and Teramo from 2008 to 2010*

Isolate	Province of origin	Yr of isolation	PFGE profile	MLST allelic profile for:					
				<i>dnaA</i>	<i>glx</i>	<i>grbB</i>	<i>metS</i>	<i>tafA</i>	ST
24a	Salamanca	2008	II	1	1	2	2	2	5
26a	Zamora	2008	II	1	1	2	2	2	5
262a	León	2008	I	1	1	2	2	2	5
276a	Valladolid	2008	I	1	1	2	2	2	5
283a	Palencia	2008	I	1	1	2	2	2	5
286a	Cantabria	2008	I	1	1	2	2	2	5
286b	Cantabria	2008	I	1	1	2	2	2	5
286c	Cantabria	2008	I	1	1	2	2	2	5
287c	Burgos	2008	I	1	1	2	2	2	5
423d	Zamora	2008	I	1	1	2	2	2	5
472d	Salamanca	2008	I	1	1	2	2	2	5
513a	Salamanca	2009	I	1	1	2	2	2	5
651a	Zamora	2009	I	1	1	2	2	2	5
653a1	Zamora	2009	I	1	1	2	2	2	5
653a2	Zamora	2009	I	1	1	2	2	2	5
657c	Valladolid	2009	I	1	1	2	2	2	5
787a	Valladolid	2009	IV	1	1	2	2	2	5
787b	Valladolid	2009	IV	1	1	2	2	2	5
787c	Valladolid	2009	IV	1	1	2	2	2	5
793a	Valladolid	2009	V	1	1	2	2	2	5
793b	Valladolid	2009	V	1	1	2	2	2	5
799a	Valladolid	2009	V	1	1	2	2	2	5
799b	Valladolid	2009	V	1	1	2	2	2	5
799c	Valladolid	2009	V	1	1	2	2	2	5
1021a	Palencia	2009	I	1	1	2	2	2	5

TABLE 1 (Continued)

Isolate	Province of origin	Yr of isolation	PFGE profile	MLST allelic profile for:					
				<i>dnaA</i>	<i>glx</i>	<i>grbB</i>	<i>metS</i>	<i>tafA</i>	ST
1026b	Zamora	2009	I	1	1	2	2	2	5
1032b	León	2009	I	1	1	2	2	2	5
1033a	León	2009	III	1	1	2	2	2	5
1033b	León	2009	III	1	1	2	2	2	5
1033c	León	2009	III	1	1	2	2	2	5
1033d	León	2009	III	1	1	2	2	2	5
1033e	León	2009	III	1	1	2	2	2	5
1043a	Valladolid	2009	I	1	6	2	2	2	18
1058b	Valladolid	2009	I	1	1	2	2	2	5
1086a	León	2010	I	1	1	2	2	2	5
1114a	Segovia	2010	I	1	1	2	2	2	5
1132a	Segovia	2010	I	1	1	2	2	2	5
1160a	Palencia	2010	I	1	1	2	2	2	5
1423a	Valladolid	2010	VI	1	6	2	2	2	18
1423c	Valladolid	2010	VI	1	6	2	2	2	18
1506a	Valladolid	2010	I	1	1	2	2	2	5
1668a	Zamora	2010	I	1	1	2	2	2	5
1680a	Burgos	2010	I	1	6	2	2	2	18
1700a	León	2010	II	1	1	2	2	2	5
1700b	León	2010	II	1	1	2	2	2	5
1700c	León	2010	II	1	1	2	2	2	5
1703a	Valladolid	2010	II	1	1	2	2	2	5
1704b	Salamanca	2010	I	1	1	2	2	2	5
Teramo	Italy	Unknown	IV	1	1	1	1	1	1
PG2	Spain	1959	IV	1	1	1	1	1	1

* PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type.

TABLE 2 DNA restriction fragments of 410 *Mycoplasma agalactiae* isolates generated by PFGE with restriction enzyme *Sma*I in Spain from 2008 to 2010*

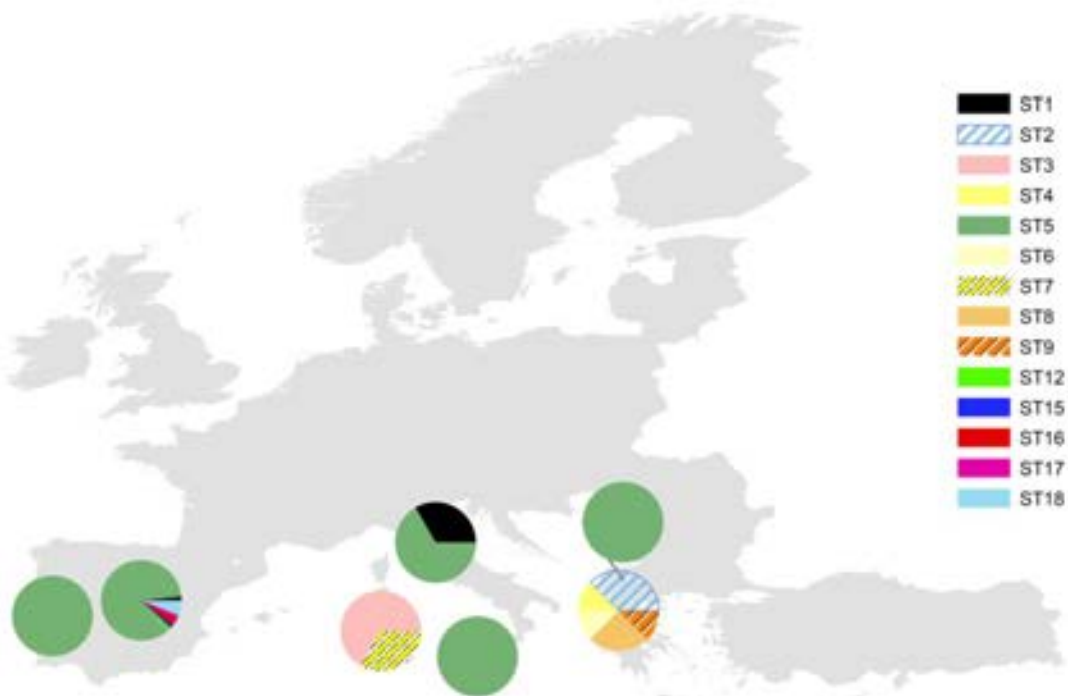
DNA fragment	Size (kbp) for pulsotype:					
	I	II	III	IV	V	VI
A	427	427	454	427	427	427
B	159	159	159	159	159	197
C	124	124	124	124	124	124
D	83	92	83	83	108	83
E	56	56	56	67	56	56
F	9	9	9	9	9	9
G	5	5	5	5	5	5
Genome size	863	872	890	874	888	901

* All the values in the table are expressed in kbp. Boldface indicates restriction fragments showing size differences from those obtained for pulsotype I, which was the most frequently isolated (93% of isolates).

number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) (3) and multi-locus sequence typing (MLST) (4). Typing systems were selected to obtain a comprehensive approach to the genomic diversity of Spanish *M. agalactiae* isolates and also to generate suitable data for evolutionary and population studies. Knowledge of the diversity and distribution of *M. agalactiae* clones will facilitate tracing the source of new international outbreaks as well as contribute to a better understanding of *M. agalactiae* population genetics and evolution.

TABLE 3 Spatial distribution of PFGE genomic profiles obtained for 410 Spanish *Mycoplasma agalactiae* field isolates from 2008 to 2010

Province of origin	PFGE pattern	No. of isolates	Total no. of isolates/province	% of isolates with PFGE pattern/province
Burgos	I	23	23	100
	Cantabria	I	3	3
León	I	55	63	87.3
	II	3		4.8
	III	5		7.9
Palencia	I	56	56	100
	Salamanca	I	28	29
	II	1	1	3.4
	Segovia	I	2	2
Valladolid	I	115	127	90.6
	II	1		0.8
	IV	3		2.4
	V	5		3.9
	VI	3		2.4
	Zamora	I		106
	II	1	1	0.9

**FIG 1** Geographic distribution of 103 European *Mycoplasma agalactiae* isolates based upon their multilocus sequence typing allelic profiles. Isolates previously subjected to MLST have been included (2). Locations of pie charts indicate the geographic origins of the isolates, and their color reflects the different sequence types (STs).

Four hundred ten *M. agalactiae* isolates collected from 171 Spanish sheep flocks from 2008 through 2010, type strain PG2 (Institut Pasteur, Paris, France), and strain Teramo (Mycoplasma Experience, Ltd., Reigate, United Kingdom) were subjected to extensive genomic characterization (see Table S1 in the supplemental material). All the information regarding the sampling and the isolation procedure is detailed in the work of Ariza-Miguel et al. (11). The species designation of the isolates was confirmed by real-time PCR targeting the *p40* gene (12, 13). All isolates were analyzed by PFGE with the restriction enzyme *Sma*I and by MLVA at 4 highly variable VNTR loci (i.e., Magal VNTR 5, Magal VNTR 14, Magal VNTR 17, and Magal VNTR 19) as previously described (3). MLST analyses (4) were carried out on a subset of 48 field isolates which showed different genomic profiles in the previous analyses, as well as on isolates from different geographic origins and times of isolation selected to yield the highest genetic variability (Table 1). A neighbor-joining dendrogram showing relatedness among isolates on the basis of their MLST allelic profiles was constructed by using BioNumerics v.6.6 software, and BURST analysis was performed with eBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>). Information about the isolates analyzed, as well as a new allelic profile, was submitted to the PubMLST database (<http://pubmlst.org/magalactiae/>).

We detected a high genomic homogeneity in *M. agalactiae* isolates from Spain using three different genotyping tools (i.e., PFGE, MLVA, and MLST). PFGE provided the highest discriminative power and was capable of distinguishing between some isolates which were largely indistinguishable by MLVA or MLST (see Table S1 in the supplemental material). Genomic characterization by PFGE identified 6 different pulsotypes which were closely related and showed very similar fingerprint patterns, with only small size differences in one band among pulsotypes (Table 2). Ninety-five percent of the isolates belonged to the same genomic profile, named pulsotype I, resulting in a Simpson's index of diversity of 0.104. Pulsotype I was found widely distributed in all the provinces sampled; it was the pulsotype of from 87% to 99% of the isolates analyzed per province. The rest of the genomic profiles were found disseminated in 3 neighboring provinces (Table 3). PG2 and Teramo strains belonged to pulsotype IV and clustered with 3 field isolates. Surprisingly, genetic profiles obtained by MLVA were largely indistinguishable, with all field isolates showing the same genetic profile at the 4 highly variable VNTR loci. Moreover, only MLVA at the Magal VNTR 17 locus was capable of distinguishing between field isolates showing a band at 285 bp and between PG2 and Teramo strains showing a band at 169 bp. The Simpson's index of diversity was determined to be 0.005. Finally, MLST analyses of the 48 field isolates revealed 2 different sequence types (STs). Forty-four out of 48 field isolates (92%) belonged to ST 5 (allelic profile 11222). The other ST was not described at that moment and, after its submission to the PubMLST database, was designated ST 18 (allelic profile 16222) (Table 1).

Overall, molecular typing revealed a high genomic homogeneity in Spanish *M. agalactiae* isolates, which clearly show the circulation of one endemic clonal population. A similar finding was recently observed in the French western Pyrenees region by Nouvel et al. (5), who reported that the endemic CA repeatedly ob-

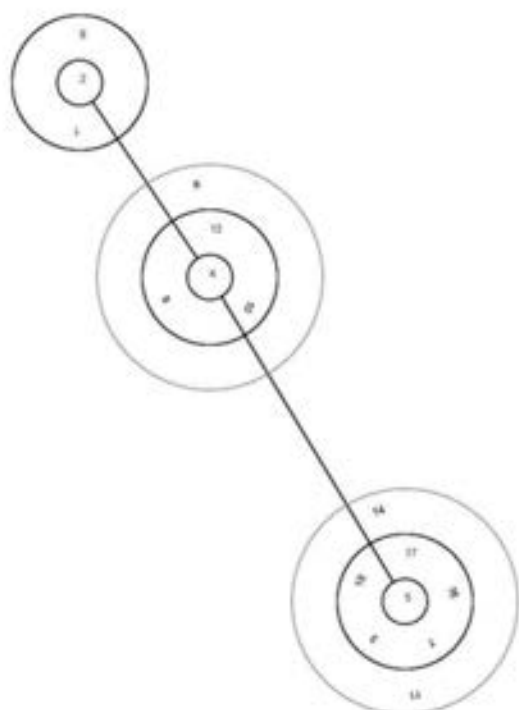


FIG 3 BURST analysis of 104 worldwide *Mycoplasma agalactiae* isolates based upon their multilocus sequence typing allelic profiles. Clonal complexes were defined as groups of multilocus genotypes in which every genetic profile shared at least 3 out of 3 loci with at least one other member of the group. Sequence type 5 was found to be the ancestral genotype. European isolates previously analyzed were added to the study (7).

served over the past 30 years in that region has been caused by a unique subtype of *M. agalactiae*. MLVA placed all the French isolates in the same genotype, designated ST 10. Interestingly, all 410 Spanish *M. agalactiae* isolates analyzed in this study were placed in the same MLVA type, suggesting that the same highly successfully adapted strain has been circulating in Spain and France during the last 2 years. To obtain further information about the endemic clone, a representative isolate, namely, 1668a, was fully sequenced, and future studies will help to clarify the molecular mechanisms involved in the evolutionary success of this clone as well as to provide new insights into the genomic diversity and evolution of the species. In contrast, several studies have reported an unexpectedly high diversity in *M. agalactiae* Spanish isolates recovered from goats (3, 4, 14). Further studies are necessary to test whether this is because various CA-causing mycoplasmas have been detected in Spanish goat herds (15–17), while *M. agalactiae* has been the only species detected in sheep, limiting the possibility of genetic exchange (11).

The global relationship of *M. agalactiae* clones on the basis of

FIG 2 Genetic relationships among 104 worldwide *Mycoplasma agalactiae* isolates based upon allelic differences at 5 housekeeping loci. Name of isolates, years of isolation, countries of origin, and sequence types (MLST) are specified to the right of the branches. Isolates previously analyzed were added to the study (7). Black dots indicate the isolates analyzed in this study. The dendrogram was produced by using the neighbor-joining method of the BioNumerics v.6.6 software.

available MLST allelic profiles also showed a high genetic homogeneity, with isolates belonging to ST 5 being widely distributed throughout many southern European countries analyzed so far (Fig. 1) (4). The 44 Spanish field isolates belonging to ST 5 examined in this study clustered with previously analyzed isolates from Spain and other southern European countries: Portugal, Italy (including Sicily and Sardinia), and Macedonia. The other 4 field isolates belonging to novel ST 18 clustered closely with the previous one, forming a new branch (Fig. 2). Interestingly, strain Teramo (Italy) and type strain PG2 (Spain) clustered with strain 10123 from the United States, suggesting an evolutionary relationship. We hypothesize that a highly adaptive genotype may have increased rapidly in frequency to produce an epidemic clone in southern Europe. Then, that clone diversified through recombination or mutation to produce minor clonal variants (18). BURST analysis supports this hypothesis, since it defined ST 5 as the adaptive ancestral genotype from which the minor clonal variants have arisen (Fig. 3). Further investigations are necessary to test that hypothesis, and the inclusion of new isolates from other geographic areas and times of isolation will help to clarify the evolution of this pathogen and its current population structure.

In conclusion, this study provides a genomic characterization of *M. agalactiae* in Spain and contributes to the better understanding of the global distribution of clones. Molecular typing revealed a high genomic homogeneity in Spanish *M. agalactiae* isolates, which clearly show the circulation of one endemic clonal population, and will facilitate the design of prophylactic measures.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by project RTA 2008-073 of the Spanish Ministry of Education and Science, Government of Spain.

We thank Nigel Cook (FERA, United Kingdom) for critical revision of the manuscript.

REFERENCES

- Solsona M, Lambert M, Poumarat F. 1996. Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Microbiol.* 50:45–58.
- Tola S, Idini G, Mamunta D, Casciano I, Rocchigiani AM, Angioi A, Leoni G. 1996. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. *FEMS Microbiol. Lett.* 143:259–265.
- McAnuliffe L, Churchward CP, Lawes JR, Loria G, Ayling RD, Nicholas RAJ. 2008. VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. *BMC Microbiol.* 8:193.
- McAnuliffe L, Gosney F, Hlasek M, de Garnica ML, Sparger J, Kargl M, Rosengarten R, Ayling RD. 2011. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *J. Med. Microbiol.* 60:803–811.
- Nouvel LX, Marenda MS, Glew MD, Sagné E, Giammarinaro P, Tardy F, Poumarat F, Rosengarten R, Citti C. 2012. Molecular typing of *Mycoplasma agalactiae*: tracing European-wide genetic diversity and an endemic clonal population. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35:487–496.
- Arcangioli MA, Adlan H, Tardy F, Poumarat F, Le Grand D. 2012. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. *Vet. J.* 192:96–100.
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I. 2001. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. *Vet. Microbiol.* 79:1–9.
- McAnuliffe L, Kokotović B, Ayling RD, Nicholas RAJ. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *J. Clin. Microbiol.* 42:4556–4565.
- Tardy F, Meccier P, Solsona M, Saras E, Poumarat F. 2007. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: prevalence and typing. *Vet. Microbiol.* 121:268–277.
- Tola S, Idini G, Rocchigiani AM, Mamunta D, Angioi PP, Rocca S, Cocco M, Leoni G. 1999. Comparison of restriction pattern polymorphism of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by pulsed field gel electrophoresis. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 46:199–206.
- Ariza-Miguel J, Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. 2012. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. *BMC Vet. Res.* 8:171.
- Fleury B, Bergeron D, Berthelot X, Peterhans E, Frey J, Vilei EM. 2002. Characterization of P40, a cytolysin of *Mycoplasma agalactiae*. *Infect. Immun.* 70:5612–5621.
- Oravcová K, López-Enríquez I, Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. 2009. *Mycoplasma agalactiae* p-80 gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J. Clin. Microbiol.* 47:445–450.
- De la Fe C, Amores I, Tardy F, Sagné E, Nouvel LX, Citti C. 2012. Unexpected genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. *BMC Vet. Res.* 8:146.
- Corrales JC, Esnal A, De la Fe C, Sánchez A, Assunção P, Poveda JB, Contreras A. 2007. Contagious agalactia in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 68:154–166.
- De la Fe C, Gutiérrez A, Poveda JB, Assunção P, Ramírez AS, Fabelo F. 2007. First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, one of the causal agents of caprine contagious agalactia, on the island of Lanzarote (Spain). *Vet. J.* 173:440–442.
- Gil MC, Peña FI, Hermoso de Mendoza J, Gomez L. 2003. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50:484–487.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:4384–4388.

TABLE S1. Summary table of isolates analyzed in this study: isolate name, time of isolation, geographic origin and PFGE & MLVA profiles.

Isolate	Month	Year	Province	PFGE profiles	MLVA			
					VNTR 5	VNTR 14	VNTR 17	VNTR 19
24a	August	2008	Salamanca	II	1	1	1	1
26a	August	2008	Zamora	II	1	1	1	1
47a	August	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
54a	August	2008	Palencia	I	1	1	1	1
61a	August	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
62a	August	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
62b	August	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
261a	October	2008	Zamora	I	1	1	1	1
262a	October	2008	León	I	1	1	1	1
266a	October	2008	León	I	1	1	1	1
276a	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
276b	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
276c	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
280a	October	2008	León	I	1	1	1	1
280b	October	2008	León	I	1	1	1	1
280c	October	2008	León	I	1	1	1	1
282a	October	2008	León	I	1	1	1	1
282b	October	2008	León	I	1	1	1	1
282c	October	2008	León	I	1	1	1	1
283a	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
283b	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
283c	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
285a	October	2008	León	I	1	1	1	1
285b	October	2008	León	I	1	1	1	1
285c	October	2008	León	I	1	1	1	1
286a	October	2008	Cantabria	I	1	1	1	1
286b	October	2008	Cantabria	I	1	1	1	1
286c	October	2008	Cantabria	I	1	1	1	1
287a	October	2008	Burgos	I	1	1	1	1
287b	October	2008	Burgos	I	1	1	1	1
287c	October	2008	Burgos	I	1	1	1	1
292a	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
292b	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
292c	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
294a	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
294b	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
294c	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1
295a	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
295b	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
295c	October	2008	Palencia	I	1	1	1	1
297a	October	2008	Valladolid	I	1	1	1	1

297b	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
297c	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
298a	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
298b	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
298c	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
299a	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
299b	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
299c	October	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
314a	November	2008	Palencia	1	1	1	1	1
314b	November	2008	Palencia	1	1	1	1	1
314c	November	2008	Palencia	1	1	1	1	1
314d	November	2008	Palencia	1	1	1	1	1
318a	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
318b	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
318c	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
318d	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
367a	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
367b	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
367c	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
367d	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
368a	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
368b	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
369a	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
369b	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
369d	November	2008	Valladolid	1	1	1	1	1
372a	November	2008	Zamora	1	1	1	1	1
372b	November	2008	Zamora	1	1	1	1	1
372c	November	2008	Zamora	1	1	1	1	1
372d	November	2008	Zamora	1	1	1	1	1
423a	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
423b	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
423c	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
423d	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
426a	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
426b	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
426c	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
426d	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
430a	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
430b	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
430c	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
430d	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
430e	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
437a	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
437b	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
437c	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
437d	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
455a	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1
455b	December	2008	Zamora	1	1	1	1	1

455c	December	2008	Zamora	I	1	1	1	1
455d	December	2008	Zamora	I	1	1	1	1
472a	December	2008	Salamanca	I	1	1	1	1
472b	December	2008	Salamanca	I	1	1	1	1
472c	December	2008	Salamanca	I	1	1	1	1
472d	December	2008	Salamanca	I	1	1	1	1
480a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
483a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
498a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
498b	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
498c	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
500a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
510a	January	2009	Salamanca	I	1	1	1	1
513a	January	2009	Salamanca	I	1	1	1	1
514a	January	2009	Salamanca	I	1	1	1	1
516a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
518a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
519a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
554a	January	2009	Zamora	I	1	1	1	1
623a	February	2009	León	I	1	1	1	1
623b	February	2009	León	I	1	1	1	1
624a	February	2009	León	I	1	1	1	1
624b	February	2009	León	I	1	1	1	1
624c	February	2009	León	I	1	1	1	1
625a	February	2009	León	I	1	1	1	1
626a	February	2009	León	I	1	1	1	1
627a	February	2009	León	I	1	1	1	1
628a	February	2009	León	I	1	1	1	1
628b	February	2009	León	I	1	1	1	1
630a	February	2009	León	I	1	1	1	1
640a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
649a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
651a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
651b	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
653a1	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
657a	March	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
657c	March	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
671a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
672a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
676a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
677a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
688a	March	2009	León	I	1	1	1	1
688b	March	2009	León	I	1	1	1	1
700a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
703a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
704a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
715a	March	2009	Zamora	I	1	1	1	1
760a	April	2009	Zamora	I	1	1	1	1

787a	April	2009	Valladolid	IV	1	1	1	1
787b	April	2009	Valladolid	IV	1	1	1	1
787c	April	2009	Valladolid	IV	1	1	1	1
793a	April	2009	Valladolid	V	1	1	1	1
793b	April	2009	Valladolid	V	1	1	1	1
799a	April	2009	Valladolid	V	1	1	1	1
799b	April	2009	Valladolid	V	1	1	1	1
799c	April	2009	Valladolid	V	1	1	1	1
835b	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
856a	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
856b	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
856c	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
857a	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
857b	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
857c	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
880a	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
880b	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
880c	May	2009	Zamora	I	1	1	1	1
892a	May	2009	Palencia	I	1	1	1	1
892b	May	2009	Palencia	I	1	1	1	1
892c	May	2009	Palencia	I	1	1	1	1
981a	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
981b	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
981c	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
981d	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
989a	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
989c	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
989d	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
990a	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
990b	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
990c	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
990d	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
991a	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
991b	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
991c	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
991d	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1021a	July	2009	Palencia	I	1	1	1	1
1021b	July	2009	Palencia	I	1	1	1	1
1021c	July	2009	Palencia	I	1	1	1	1
1026b	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1026c	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1031a	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1031b	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1031c	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1031d	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1031e	July	2009	Zamora	I	1	1	1	1
1032b	July	2009	León	I	1	1	1	1
1033a	July	2009	León	III	1	1	1	1

1033b	July	2009	León	III	1	1	1	1
1033c	July	2009	León	III	1	1	1	1
1033d	July	2009	León	III	1	1	1	1
1033e	July	2009	León	III	1	1	1	1
1033f	July	2009	León	I	1	1	1	1
1035a	July	2009	León	I	1	1	1	1
1035b	July	2009	León	I	1	1	1	1
1035c	July	2009	León	I	1	1	1	1
1043a	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1043b	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1043c	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1049c	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1049d	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1057a	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1057c	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1058b	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1059a	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1059b	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1059c	July	2009	Valladolid	I	1	1	1	1
1072a	April	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1072b	April	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1086a	April	2010	León	I	1	1	1	1
1088a	April	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1088b	April	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1089a	April	2010	León	I	1	1	1	1
1099a	April	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1099b	April	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1106a	April	2010	León	I	1	1	1	1
1114a	April	2010	Segovia	I	1	1	1	1
1132a	April	2010	Segovia	I	1	1	1	1
1141a	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1141b	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1141c	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1141d	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1149a	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1149b	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1152a	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1152b	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1156a	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1156b	May	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1160a	May	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1161a	May	2010	León	I	1	1	1	1
1162a	May	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1162b	May	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1162c	May	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1163a	May	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1163b	May	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1171a	May	2010	León	I	1	1	1	1

1172a	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1173a	May	2010	Burgos	1	1	1	1	1
1173b	May	2010	Burgos	1	1	1	1	1
1173c	May	2010	Burgos	1	1	1	1	1
1175a	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1175b	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1175c	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1176a	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1176b	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1177a	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1178a	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1178b	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1178c	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1179a	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1179b	May	2010	Palencia	1	1	1	1	1
1187a	May	2010	León	1	1	1	1	1
1187b	May	2010	León	1	1	1	1	1
1188c	May	2010	León	1	1	1	1	1
1189a	May	2010	León	1	1	1	1	1
1189b	May	2010	León	1	1	1	1	1
1189c	May	2010	León	1	1	1	1	1
1190a	May	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1190b	May	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1190c	May	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1194b	May	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1220a	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1220b	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1220c	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1223a	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1223b	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1230a	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1230b	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1230c	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1236a	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1236b	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1238a	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1238b	June	2010	Valladolid	1	1	1	1	1
1271b	June	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1271c	June	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1271d	June	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1290a	June	2010	Zamora	1	1	1	1	1
1357a	July	2010	León	1	1	1	1	1
1357b	July	2010	León	1	1	1	1	1
1357c	July	2010	León	1	1	1	1	1
1357d	July	2010	León	1	1	1	1	1
1357e	July	2010	León	1	1	1	1	1
1357f	July	2010	León	1	1	1	1	1
1362a	July	2010	Palencia	1	1	1	1	1

1362b	July	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1362c	July	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1362d	July	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1389a	July	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1389b	July	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1420a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1420b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1420c	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1421a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1421b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1423a	August	2010	Valladolid	VI	1	1	1	1
1423b	August	2010	Valladolid	VI	1	1	1	1
1423c	August	2010	Valladolid	VI	1	1	1	1
1424a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1424b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1424c	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1425a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1425b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1425c	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1426a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1426b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1426c	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1427a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1433a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1433b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1433c	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1433d	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1433e	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1439a	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1439b	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1439c	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1439d	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1439e	August	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1483a	August	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1483b	August	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1483c	August	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1483d	August	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1483e	August	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1501a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1503a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1503b	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1503c	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1503d	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1505a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1506a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1506b	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1506c	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1511a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1

1511b	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1512a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1512b	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1512c	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1512d	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1539a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1541a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1542a	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1555a	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1555b	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1555c	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1555d	September	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1557a	September	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1557b	September	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1557c	September	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1558a	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1558b	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1559a	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1559b	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1563a	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1563b	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1563c	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1563e	September	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1661a	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1661b	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1661c	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1668a	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1668b	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1668c	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1668d	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1668e	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1668f	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1672a	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1672b	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1672c	November	2010	Zamora	I	1	1	1	1
1680a	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1680b	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1680c	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1680d	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1680e	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1697a	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1697b	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1697c	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1697d	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1697e	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1698a	November	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1700a	November	2010	León	II	1	1	1	1
1700b	November	2010	León	II	1	1	1	1

1700c	November	2010	León	II	1	1	1	1
1703a	November	2010	Valladolid	II	1	1	1	1
1703b	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1703c	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1704a	November	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1704b	November	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1704c	November	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1707a	November	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1707b	November	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1707c	November	2010	Salamanca	I	1	1	1	1
1712a	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1712b	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1712c	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1720a	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1720b	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1720c	November	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1729a	November	2010	León	I	1	1	1	1
1729b	November	2010	León	I	1	1	1	1
1729c	November	2010	León	I	1	1	1	1
1734a	November	2010	León	I	1	1	1	1
1734b	November	2010	León	I	1	1	1	1
1734c	November	2010	León	I	1	1	1	1
1751a	November	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1751b	November	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1751c	November	2010	Palencia	I	1	1	1	1
1753a	November	2010	León	I	1	1	1	1
1753b	November	2010	León	I	1	1	1	1
1753c	November	2010	León	I	1	1	1	1
1760a	December	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1760b	December	2010	Valladolid	I	1	1	1	1
1771a	December	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1771b	December	2010	Burgos	I	1	1	1	1
1771c	December	2010	Burgos	I	1	1	1	1
PG2	Unknown	1959	Unknown	I	1	1	2	1
Teramo	Unknown	Unknown	Italy	I	1	1	2	1

Staphylococcus aureus
resistente a meticilina

Sección 3.2



Sección 3.2.1

Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital in northwestern Spain

Jaime Ariza-Miguel¹, Marta Hernández¹, Isabel Fernández-Natal^{2,3} y David Rodríguez-Lázaro^{1,4}

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, C.P. 47071 Valladolid, Spain; ²University Hospital of León, Spain, ³Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, ⁴Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Publicado en *International Microbiology*. 2014. Vol. 17, 149-157

Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital in northwestern Spain

Jaime Ariza-Miguel,¹ Marta Hernández,¹ Isabel Fernández-Natal,^{2,3}
David Rodríguez-Lázaro^{1,4*}

¹Institute of Agricultural Technology of Castilla y León, Valladolid, Spain. ²University Hospital of León, León, Spain.

³Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León, Spain.

⁴Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Received 10 April 2014 · Accepted 30 September 2014

Summary. Continuous monitoring of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is necessary to understand the clonal evolution of successful lineages. In this study, we identified the MRSA clones circulating in a Spanish hospital during a 2-year period, assessed their relationship with antimicrobial resistance profiles, and investigated the presence of the emerging community-associated and livestock-associated MRSA lineages (CA-MRSA, LA-MRSA). CC5-MRSA-IV isolates were the most frequently recovered, which supports the previously reported prevalence of this clone in Spanish hospitals. We observed ST125 isolates that harbored specific cassette chromosome recombinase (*ccr*) gene elements of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types IV and VI. That clone, which was first detected only recently, has increased resistance to erythromycin. Furthermore, 94% of the infections were caused by non-multiresistant isolates. Neither CA-MRSA nor LA-MRSA isolates were observed. These findings, along with related events over the last decade, suggest the establishment of a clonal endemic population in the Spanish clinical environment. [Int Microbiol 2014; 17(3):149-157]

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) · clonal population · molecular epidemiology · multilocus sequence typing

Introduction

Staphylococcus aureus is an opportunistic pathogen that causes a wide range of diseases in humans, from mild skin infections to life-threatening diseases such as toxic shock syndrome, septicemia, endocarditis, and necrotizing pneumonia. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was

first described in 1960, a year after the introduction of methicillin into clinical practice to treat infections caused by penicillin-resistant strains of *S. aureus* [11]. Methicillin resistance is mediated by the presence of the *mecA* gene, which encodes an additional penicillin-binding protein (PBP2a or PBP2') with low affinity for β -lactam antibiotics [15]. More recently, a novel methicillin-resistance determinant, *mecA*_{LA255} or *mecC*, has been described that has 70% homology at the DNA level with *mecA* [9]. Those genes are harbored in a highly diverse mobile genetic element, the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), whose transmission to ecologically successful methicillin-susceptible *S. aureus* strains (MSSA) led to the emergence of the ancestral MRSA lineages [12]. Up to 11 SCC*mec* types, defined by combining the ge-

*Corresponding author: D. Rodríguez-Lázaro
Microbiology Section, Faculty of Sciences
University of Burgos
Pl. Misael Babuelos, s/n
09001 Burgos, Spain
Tel. +34-637451100
E-mail: rodrilad@ gmail.com

netic structures of the cassette chromosome recombinase (*ccr*) gene complex and the *mec* gene complex, have been described [www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html]. Thus, MRSA isolates are represented not only by their genetic backgrounds, but also by the genetic structure of their SCC_{mec} elements [8].

MRSA lineages have become a truly global health concern over the last few decades, as their worldwide spread has occurred very quickly. The prevalence of MRSA greatly varies among countries, provinces and hospitals but it has increased significantly since its appearance in 1960. In the USA, MRSA infections increased from 4% in the 1980s to 50% of all *S. aureus* infections in the late 1990s [24]. In Spain, MRSA infections increased from 1.5% in 1986 to 31.2% in 2002 [34]. In the worst cases, such as in Taiwan, in 2007 MRSA accounted for 80% of all *S. aureus* isolates causing nosocomial infections [36]. However, the scenario has become even more complex. Until the mid 1990s the presence of MRSA was restricted to the clinical environment (hospital-acquired MRSA, HA-MRSA), but since then MRSA strains have been recovered increasingly from the community (community-acquired MRSA, CA-MRSA) [33]. In contrast to HA-MRSA, CA-MRSA strains are frequently isolated from children and young people without previous health-care contact and they show specific genetic and phenotypic traits: they have a different genetic background, harbor a smaller SCC_{mec} type IV or V, which provides them with a selective advantage in terms of faster replication times, present more virulence mediated by factors such as the Pantone-Valentine leukocidin cytotoxin (PVL), and usually have a non-multiresistant antimicrobial profile [26].

The recurrent penetration of CA-MRSA into the clinical environment has blurred the boundary between HA-MRSA and CA-MRSA, making it more difficult to discriminate between them. In addition, a livestock-associated MRSA (LA-MRSA) has been described. LA-MRSA strains may act as genetic reservoirs of resistance and could play a major role in the adaptive evolution of MRSA. In fact, the recently described methicillin resistance gene *mecC* was originally detected in LA-MRSA strains but is now increasingly recovered from clinical settings [9,27]. Continuous molecular epidemiologic surveillance of MRSA is imperative to trace the evolution and spread of successful MRSA clones, both for therapeutic reasons and for the implementation of initiatives aimed at controlling and preventing MRSA infections. Here we describe a molecular epidemiology study of MRSA isolates recovered from the University Hospital of Leon from 2007 to 2008. The genetic backgrounds of these isolates were charac-

terized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST), and the structures of the respective SCC_{mec} elements were determined. Furthermore, we investigated both the antimicrobial resistance profiles of CA-MRSA and the presence of their PVL genes, as markers. By identifying the MRSA clones circulating in the hospital, this study contributes to the knowledge of the MRSA lineages circulating in Spanish health-care setting.

Materials and methods

Clinical information and bacterial isolates. Seventy *Staphylococcus aureus* isolates recovered from patients at the University Hospital of Leon (Leon, northwest Spain), between 2007 and 2008 were determined to be MRSA based on antimicrobial susceptibility testing. The University Hospital of Leon is a 795-bed public teaching hospital. Forty-nine isolates were recovered from blood cultures (one of them was recovered also from bile); 14 from central venous catheter blood samples; 3 from peripheral vascular catheter blood samples; 1 from packed red blood cells; 1 from a drainage sample; 1 from synovial joint fluid; and 1 from ascites. The specimens were isolated and identified in conventional medium (marinell salt agar, blood and chocolate agar plates) and commercial MicroScan microdilution panels (Siemens Diagnostics, Marib, Germany) and by real-time PCR [32] in a 7500 real-time PCR system platform (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Methicillin resistance was confirmed in 68 of the 70 isolates by using internal amplification controls designed within the *mecA* gene [33,22]. Isolates SA13 and SA65, which were MRSA as revealed by antimicrobial susceptibility testing, tested negative for the presence of *mecA*. Repetition of the susceptibility tests confirmed both isolates as MSSA.

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the microdilution method following the recommendations and minimal inhibitory concentration (MIC) breakpoints of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (2008). Susceptibility to the following 15 antimicrobial agents was tested: ampicillin, penicillin, oxacillin, amoxicillin/clavulanate, cefotaxime, erythromycin, clindamycin, teicoplanin, vancomycin, ciprofloxacin, imipenem, gentamicin, rifampicin, tetracycline, and cotrimoxazole. MRSA isolates were clustered in resistance profiles (RPs) according to their susceptibility to 10 antimicrobials: ampicillin, penicillin, erythromycin, teicoplanin, vancomycin, ciprofloxacin, imipenem, rifampicin, tetracycline, and cotrimoxazole. Isolates resistant to three or more antibiotics, in addition to β -lactams, were considered to be multiresistant.

Characterization of the genetic background. Genetic characterization of all *S. aureus* isolates was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). PFGE was performed following the method McDougal et al. [16] modified as follows: bacterial cells were suspended in PIV buffer (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8) to an absorbance of 0.9–1.1 at 610 nm. Then, 200 μ l of the adjusted culture was washed and resuspended in 300 μ l of the same buffer. After the lysis step, the plugs were transferred into a new tube containing 1 ml ESP buffer (1% N-laurylsarcosine in 0.5 M EDTA pH 8, 100 μ g proteinase K/ml) and incubated at 56°C for 16–20 h. DNA fragment sizes were determined by comparing bands with a Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs). PFGE profiles were analyzed using BioNumerics v.6.6 (Applied-Maths NV, Simonsartens-Latem, Belgium) to describe genetic relationships among isolates.

Dendrograms were constructed using the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm. MLST was carried out as previously described [8]. DNA isolation was performed using the commercial kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. To guarantee analysis of identical genetic material by PFGE and MLST, DNA from the same culture was used for both methods. Allelic profiles obtained by MLST were assigned by comparing the consensus sequences with the information already published in the *S. aureus* MLST database hosted at [http://saureus.mlst.net]. Thereby, genotypes were constituted by seven numbers representing the unique allelic profiles at seven housekeeping genes. Data regarding the 70 isolates analyzed, as well as the novel allelic profiles were submitted to the MLST database. Allelic profiles were used to compare the *S. aureus* isolates recovered from our hospital with those previously analyzed from other geographic areas. Simpson's index of diversity, which measures the probability that two unrelated strains sampled from the test population will be placed into different typing groups [10], was calculated to compare the discriminative power of PFGE typing versus MLST and for measuring genetic diversity among isolates using the comparing partitions website [http://darwin.phylotree.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home]. The adjusted Wallace coefficient for quantification of the agreement between PFGE typing and MLST was calculated on that website.

Typing and subtyping of the SCCmec element. The genetic structure of the SCCmec element was determined by multiplex-PCR carried out on a Veriti 96-Well thermal cycler and GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) as described elsewhere [13,22]. These two molecular methods allowed discrimination of SCCmec types I, II, III, IV, V and VI, as well as the variants IA & IIIA. SCCmec IV was further subtyped into eight different subtypes, from IVa to IVh, by multiplex-PCR as previously described [18].

Detection of Pantone-Valentine leukocidin virulence factors. The presence of the PVL genes (*hlyS-PV* & *hlyF-PV*) was investigated by conventional PCR as previously described [14]. Reference strain ATCC 49775 was used as the positive control.

Results

Antimicrobial susceptibility testing. All 68 MRSA isolates were resistant to the β -lactam antibiotics tested (oxacillin, ampicillin, penicillin, cefotaxime and imipenem) as well

as to amoxicillin/clavulamate and ciprofloxacin. Furthermore, 42.6% of the isolates were resistant to erythromycin, 21% were resistant to clindamycin, 15.9% were resistant to gentamicin, 4.4% to rifampicin and 1.5% to both tetracycline and cotrimoxazole. Of the isolates resistant to erythromycin, 34.8% had the M phenotype. All isolates were susceptible to the glycopeptide antimicrobial agents vancomycin and teicoplanin. The isolates were clustered into five RPs, with all the isolates resistant to the β -lactam antibiotics tested and to at least one more antimicrobial agent (Table 1). Notably, the percentage of MRSA resistant to gentamicin increased from 5.7% in 2007 to 28.6% in 2008. Resistance to erythromycin, rifampicin, tetracycline, and cotrimoxazole also increased during the study period albeit to a lesser extent, while resistance to clindamycin decreased from 23.5% in 2007 to 17.9% in 2008 (Table 2).

Genetic background. Genetic characterization of all 70 *S. aureus* isolates by PFGE with the restriction enzyme *Sma*I revealed 27 different pulsotypes (25 pulsotypes among the 68 MRSA isolates), resulting in a Simpson's index of diversity of 0.909, which indicated that, if two isolates were sampled randomly from the population, on 90.9% of the occasions they would fall into different types. Genotypes 19 and 26 accounted for 40% of the isolates (17.1% and 22.9%, respectively). A dendrogram constructed using the Dice similarity coefficient with the UPGMA clustering algorithm revealed four major clusters (arbitrarily designated from A to D) with a cutoff of 90% similarity. More than 81% of the isolates were grouped into these four genetic clusters. Genotypes that did not belong to these clusters were designed as "sporadic." Cluster A comprised 18 ST5-MRSA-IV isolates, two novel sequence types (STs) derived from ST-5, and one ST125-MRSA-IV. Cluster B comprised ten ST125-MRSA-IV and one ST5-MRSA-IV.

Table 1. Resistance profiles of 68 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at the University Hospital of Leon, 2007 and 2008

Resistance profile	Antimicrobial agent ^a	% MRSA clones	
RP0	Only to β -lactams	0	None
RP1	CIP	55.2	ST5-IV(10); ST8-IV(14); ST125-IV(12); ST125-IV/V8(2)
RP2	ERY, CIP	38.8	ST5-IV(10); ST8-IV(1); ST125-IV(4); ST125-IV/V8(8); ST228-8(1); ST2755-IV(1); ST2756-IV(1)
RP3	ERY, CIP, RIF	3	ST5-IV(2)
RP4	ERY, CIP, COT	1.5	ST8-IV(1)
RP5	CIP, RIF, TET	1.5	ST5-IV(1)

^aAll isolates were resistant to the β -lactam antibiotics tested: oxacillin, ampicillin, penicillin, cefotaxime and imipenem. CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; RIF, rifampicin; COT, cotrimoxazole; TET, tetracycline.

Table 2. Evolution of the resistance to antimicrobials by 68 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, University Hospital of Leon, 2007 and 2008

Antibiotic ^a	2007 ^b	2008 ^b	Δ2008-2007 ^c
Erythromycin	41.7	43.8	+2.1
Clindamycin	23.5	17.9	-5.6
Gentamycin	3.7	28.6	+22.9
Rifampicin	2.8	6.3	+3.5
Tetracycline	0	3.1	+3.1
Cotrimoxazole	0	3.1	+3.1

^aAll MRSA isolates were resistant to the β-lactam antibiotics tested: oxacillin, ampicillin, penicillin, cefotaxime, and imipenem. They were also resistant to amoxicillin/clavulanate and ciprofloxacin, and were susceptible to vancomycin and telicoplanin.

^bPercentage of the mean values of antibiotic resistance.

^cDifferences between the percentages of the mean values of antibiotic resistance in 2007 and 2008.

Cluster C grouped nine ST125-MRSA-IV/VI isolates, and cluster D all sixteen ST8-MRSA-IV isolates (Fig. 1).

Overall, among the 68 MRSA isolates, six STs were determined by MLST analysis. Three of the six accounted for 95.6% of the isolates: ST-125 (38.2%), ST-5 (33.8%), and ST-8 (23.5%). ST-228 and two novel STs were also detected, in one isolate each. Detected clones belonged to the clonal complexes CC5 (76.5%) and CC8 (23.5%). After submission to the *S. aureus* MLST database [http://saureus.mlst.net/], novel STs were designated as ST-2755 and ST-2756 (allelic profiles 314-4-1-4-12-1-10 and 1-4-1-4-12-1-320 at *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, and *yqiL*, respectively). The novel STs were very similar to ST-5: ST-2755 had a unique difference of a single nucleotide polymorphism (SNP) in nucleotide 39 of *arcC*, showing 99% similarity with *arcC* allele 1. However, this difference at the DNA level was not translated into the functional level since both codons encoded the amino acid threonine. In addition, ST-2756 had a SNP in nucleotide 256 of allele 10 of *yqiL* (99% similarity), where thymine is replaced by guanine. This change leads to a non-synonymous substitution in which cysteine is substituted by glycine in the encoded protein. MSSA isolates SA 13 and SA 65 belonged to ST-15 and ST-5, respectively. In 2007, the most frequently recovered isolates belonged to ST-5 and ST-125 (38.9% each one), followed by ST-8 (19.4%). ST-2756 was recovered just one isolate. In 2008, isolates showing ST-125 were the most frequently isolated (37.5%), followed by those of ST-5 and ST-8 (28.1% each). ST-228 and ST-2755 were also sporadically observed in one isolate.

Genetic structure of the SCCmec element. The genetic structure of the SCCmec element was investigated in all *S. aureus* isolates. During the 2-year study period, 67 out of

68 MRSA isolates (98.5%) harbored SCCmec type IV; the remaining isolate (SA16) harbored SCCmec type I (1.5%). Further subtyping of SCCmec IV revealed that all belonged to subtypes IVc/IVe. Note that, 38.5% of the ST125-MRSA-IV isolates (14.9% of all isolates harboring SCCmec IV) also had specific *ccr* gene elements of SCCmec type VI (*mecA* gene complex class B and *ccr* gene complexes type 2 and 4; A2B2 and A4B4, respectively) and consequently were designated as ST125-MRSA-IV/VI. Furthermore, 37 out of the 67 (55.2%) SCCmec type IV elements contained an additional 381-bp DNA fragment according to the system previously described by Oliveira and Lencastre [22], corresponding to the presence of the kanamycin/neomycin/bleomycin resistance plasmid pUB110. The evolution of the MRSA clones circulating at our hospital over the 2-year study period are shown in Fig. 2.

Congruence between PFGE-typing and MLST.

PFGE better discriminated among the 70 *S. aureus* isolates than MLST (Simpson's index of diversity of 0.909 and 0.701, respectively). The adjusted Wallace coefficient PFGE→MLVA was 0.883, with a 95% confidence interval (CI) of 0.765–1.000; the coefficient for MLVA→PFGE was 0.208 (CI 95%; 0.137–0.279). These values implied that if two isolates were in the same pulsotype, they had an 88.3% chance of having the same MLST genotype; conversely, sharing the same MLST type was associated with only a 20.8% chance of having the same pulsotype. Two discordant results (group violations) were obtained by PFGE typing. Isolate SA 45, belonging to ST-125, clustered closely with isolates showing ST-5. Conversely, isolate SA 29, which belonged to ST-5, was clustered in a branch closely related to other isolates from ST-125 (Fig. 1). The molecular typing results are summarized in Table 3.

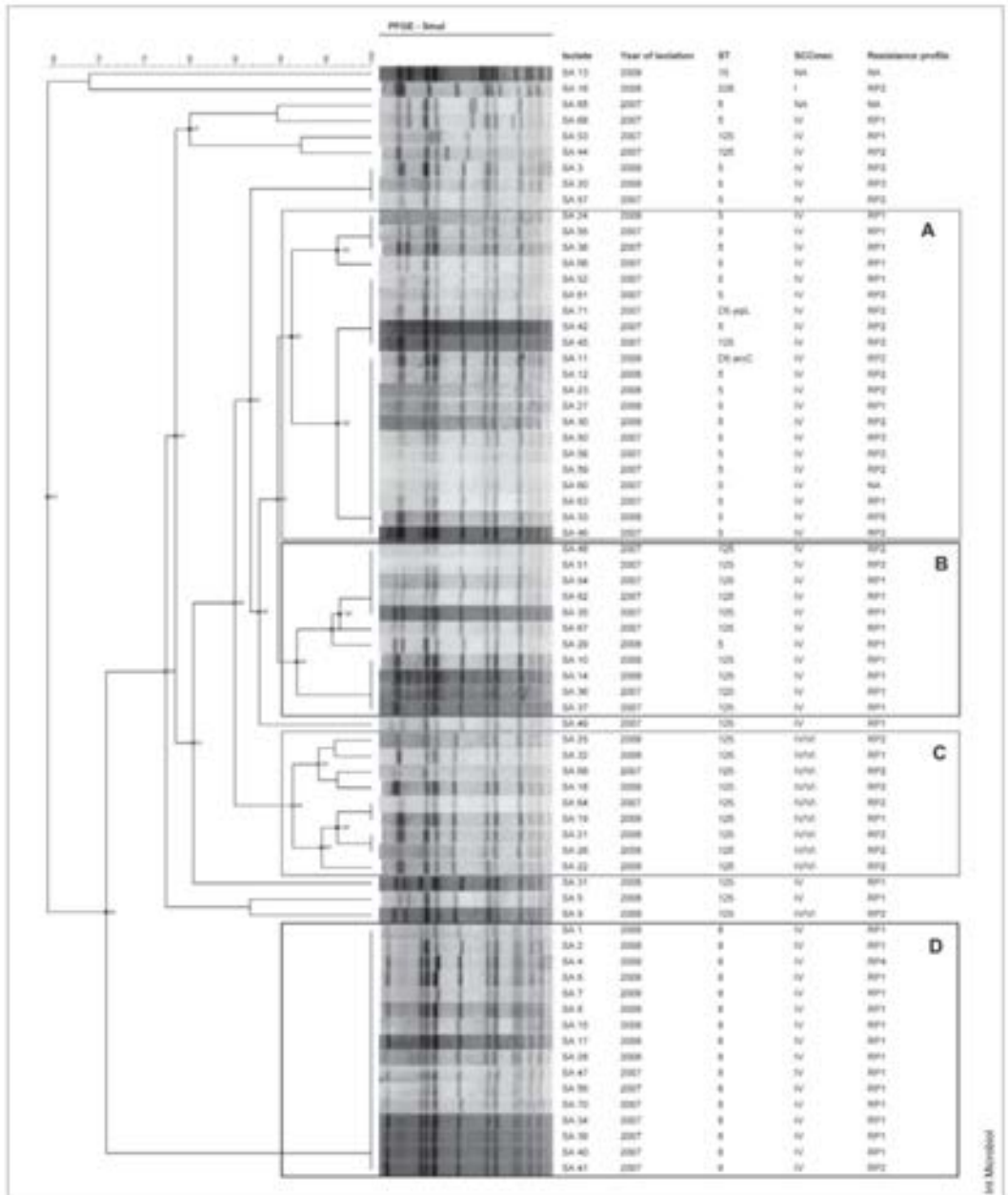


Fig. 1. Genetic relationships among 70 *Staphylococcus aureus* isolates based upon comparisons of the pulsed-field gel electrophoresis profiles obtained with the restriction enzyme *SmaI*. The dendrogram was produced using a Dice similarity coefficient matrix with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). Major clusters with a cutoff of 90 % similarity were arbitrarily designated from A to D. Scale bar indicates similarity values.

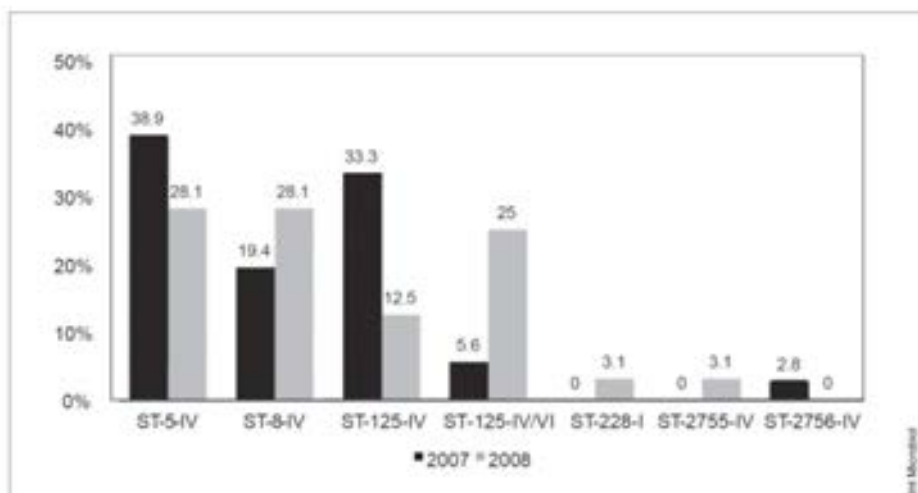


Fig. 2. Clonal evolution of 68 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from 2007 to 2008 at the University Hospital of León.

Panton-Valentine leukocidin genes. All 70 *S. aureus* isolates tested negative for the presence of the PVL genes (*lukS-PV* and *lukF-PV*). Type strain ATCC 49775, included as a positive control, gave the expected 433-bp DNA fragment in all PCRs.

Discussion

In 2006, MRSA in Spain accounted for 30% of all *S. aureus* clinical isolates [5]. Until 1995, ST247-MRSA-I (classically known as the 'Iberian clone') had been the most frequently observed type in the clinical environment. However, this clone has been gradually replaced by others, and nowadays, ST5-MRSA-IV and ST125-MRSA-IV are the predominant clones in Spanish hospitals [28,34,35]. The results of our study are in agreement with that trend: in 2007–2008, the recovery rate of MRSA at the University Hospital of León reached 38.7%. Overall, ST5-MRSA-IV was the most frequently detected clone (33.8%), followed by ST125-MRSA-IV (23.5%), ST8-MRSA-IV (23.5%), and ST125-MRSA-IV/VI (14.7%). Moreover, ST228-MRSA-I and two novel STs were sporadically recovered, accounting for one isolate each (1.5%). ST125 isolates have rarely been recovered worldwide, according to the *S. aureus* MLST database [http://saureus.mlst.net]. In fact, only 7 out of the 5024 isolates available

from that database belong to ST125 (0.14%, on 08/27/2013). Four of the isolates occurred in Spain, and the other three in Norway, Finland, and France, respectively. The reason for the apparent evolutionary success of clone ST125-MRSA-IV in Spanish hospitals is unclear, nor is it understood why that clone has not spread to other European countries.

Previous studies had reported the gradual replacement in the clinical setting of multiresistant SCC_{mec} elements—classically found in HA-MRSA isolates—by SCC_{mec} IV, which was initially detected in CA-MRSA isolates and harbors no further resistance elements [17,20,23,28,30,34,35]. The genetic structure of the SCC_{mec} elements analyzed in this study supports that finding, since 98.5% of the isolates in this study harbored SCC_{mec} IV (14.9% of them also harbored specific *ccr* gene elements of SCC_{mec} type VI). The successful introduction and persistence of the genetically shorter SCC_{mec} IV in clinical settings might have provided MRSA strains with an evolutionary advantage in terms of faster replication times, allowing them to outcompete the previously prevalent HA-MRSA clones harboring multiresistant SCC_{mec} types [21]. Further subtyping of SCC_{mec} IV revealed that all of them belonged to subtype IVc/IVe. Previous nationwide studies reported that around 70% of all MRSA isolates harboring SCC_{mec} IV belong to subtype IVa [17,28,35]. However, our findings are in agreement with those published by Argudín et al. [2], in which 88.5% of MRSA isolates carry subtype IVc. Note that the study

Table 3. Correlation between the genotyping methods used in 70 *Staphylococcus aureus* isolates (68 MRSA), at the University of León Hospital, 2007 and 2008

CC(n)	ST(n)	Allelic profile	PFGE cluster(n)	SCCmec type(n)	MRSA clone(n)
CC5(54)	5(24)	1-4-1-4-12-1-10	A(18)	IV(18)	ST5-MRSA-IV(23); ST5-MSSA(1)
			B(1)	IV(1)	
			Sporadic(5)	IV(4); None(1)	
			A(1)	IV(1)	
			B(10)	IV(10)	
	125(26)	1-4-1-4-12-1-54	C(9)	IV/VI(9)	ST125-MRSA-IV(16); ST125-MRSA-IV/VI(10)
			Sporadic(6)	IV(5); IV/VI(1)	
	15(1)	13-13-1-1-12-11-13	Sporadic(1)	None(1)	ST15-MSSA(1)
	228(1)	1-4-1-4-12-24-29	Sporadic(1)	I(1)	ST228-MRSA-I(1)
	2755(1) [†]	314-4-1-4-12-1-10	A(1)	IV(1)	ST2755-MRSA-IV(1)
2756(1) [†]	1-4-1-4-12-1-320	A(1)	IV(1)	ST2756-MRSA-IV(1)	
CC8(16)	8(16)	3-3-1-1-4-4-3	D(16)	IV(16)	ST8-MRSA-IV(16)

CC, clonal complex; ST, sequence type; PFGE, pulse-field gel electrophoresis; SCCmec, staphylococcal cassette chromosome mec; MLST, multilocus sequence typing.

[†]Pulsotypes that did not belong to the main clusters were designed as "sporadic."

[‡]Methicillin-susceptible *S. aureus* did not harbor a SCCmec element.

[§]Novel genotype as determined by MLST.

of Argudín et al. was performed in a hospital located in Asturias, the neighbor region of León. Further research is necessary to clarify whether, in Spain, there is a correlation between SCCmec types and their geographical origin.

The successful establishment of SCCmec IV in the clinical environment has led to a global change in MRSA resistance profiles. Many studies have reported the gradual replacement of the classical multiresistant HA-MRSA clones by non-multiresistant isolates harboring SCCmec IV [1,2,6,25,31,33]. Accordingly, in this work 94% of MRSA isolates were non-multiresistant, as they were resistant to only one or two antibiotics in addition to β -lactams (RP1 and RP2) (Table 1). This scenario is in agreement with the presence of the prevalent lineage CC5 harboring SCCmec IV, which carries no further resistance elements. Moreover, all the isolates were susceptible to glycopeptides. The increase in gentamicin resistance—from 5.7% in 2007 to 28.6% in 2008 (Table 2)—was not associated with any particular genotype.

The presence of CC5-MRSA strains harboring multiple or composite SCCmec elements has been previously reported [19]. In this study, we found ST125 isolates that carried specific *ccr* gene elements of both SCCmec types IV and VI (38.5% of ST125 isolates and 14.9% of all isolates harboring SCCmec IV). This clone was recently detected in a third-level hospital

in Valladolid, a neighbor city of León [17]. Nine out of the ten isolates were grouped into cluster C by PFGE, and the remaining one yielded a sporadic pulsotype (Fig. 1). The recovery rate of ST125-MRSA-IV/VI increased from 5.6% in 2007 to 25% in 2008, while the presence of ST125-MRSA-IV decreased from 33.3% in 2007 to 12.4% in 2008 (Fig. 2). As previously observed by Menegotto et al. [17], in our study, 80% of ST125-MRSA-IV/VI isolates but just 25% of ST125-MRSA-IV isolates were resistant to erythromycin (RP2). These findings suggest that the clonal replacement observed might have occurred because of antibiotic selective pressure.

Two novel STs, designated ST-2755 and ST-2756, were detected in this study. Both genotypes were single-locus variants of ST5 belonging to CC5. ST-2755 had one SNP in nucleotide 39 of allele 1 of *arcC*, and ST-2756 one SNP in nucleotide 256 of allele 10 of *yqiL*. These STs might have emerged as punctual mutations from ST5-MRSA isolates since both are single-locus variants of ST5 and, to our knowledge, this genotype has not been observed in MSSA strains (or at least there are no *S. aureus* strains with those genotypes in the MLST database). Both strains were recovered from blood culture samples, were RP2, and were grouped by PFGE into cluster A, along with ST5 isolates. Moreover, neither CA-MRSA nor LA-MRSA strains were detected in this study, and

all 70 isolates tested negative for the presence of PVL genes. According to previous studies carried out in Spanish clinical settings, it seems that, despite worldwide emergence of CA-MRSA strains harboring PVL genes [33], this is still an atypical situation in Spain and is mainly restricted to the introduction of exotic strains from South America [3,4,29].

As expected, molecular typing by PFGE provided better discrimination than MLST (Simpson's index of diversity of 0.909 vs. 0.701, respectively). We observed two group violations by PFGE (Fig. 1), which has been previously reported since these two typing methods index very different types of variations. PFGE-typing can detect genomic variations with a wide range of causes, and thus identify minor variations among isolates collected within a restricted geographic area (e.g., in one hospital). However, such rapidly evolving sequences are susceptible to homoplasy, which can lead to incorrect phylogenetic inferences. MLST indexes variations in seven housekeeping genes under stabilizing evolution, and is therefore more suitable for population studies.

Continuous monitoring of MRSA clones circulating in clinical settings is necessary to better understand the clonal evolution of successful MRSA lineages and to apply appropriate treatment, control, and prevention strategies aimed at hindering the dissemination of MRSA infections. Our molecular epidemiology study of MRSA isolates in a Spanish health-care institution identified CC5-MRSA-IV strains (ST5-MRSA-IV and ST125-MRSA-IV clones) as the most frequently recovered strains, which confirms the previously reported prevalence of these clones in the Spanish clinical environment.

Acknowledgments. This work was supported by EU 7th Framework Programme under the project PROMISE (project.265877). We thank Hortensia Rodríguez Póllán for her technical assistance, and Dr. Bruno González-Zorn for kindly providing MRSA strain ATCC 49775, used as a positive control for the presence of the PVL genes.

Competing interests. None declared.

References

- Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, et al. (2007) Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. *J Clin Microbiol* 45:2881-2888
- Argudín MA, Mendoza MC, Méndez FJ, Martín MC, Guerra B, Rodicio MR (2009) Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 47:2097-2105
- Blanco R, Tristan A, Erpeleta G, Larsen AR, Bes M, Etienne J, Citeria R, Laurent F (2011) Molecular epidemiology of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Spain: emergence of the USA300 clone in an autochthonous population. *J Clin Microbiol* 49:433-436
- Cercenado E, Cuevas O, Marín M, Bouza E, Trincado P, Boquete T, Padilla B, Vindel A (2008) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: Transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:143-149
- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T, Marín M, Bouza E: Grupo Español para el Estudio de Estafilococo (2008) *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006). *Enferm Infect Microbiol Clin* 26:269-277
- Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Corde M, Sánchez-Somolinos M, Bouza E (2004) Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4240-4245
- De Angelis G, Francois P, Lee A, Schrenzel J, Renzi G, Girard M, Pittet D, Harbarth S (2011) Molecular and epidemiological evaluation of strain replacement in patients previously harboring gentamicin-resistant MRSA. *J Clin Microbiol* 49:3880-3884
- Ehrlich MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt HG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7687-7692
- García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, et al. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homolog in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11:595-603
- Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465-2466
- Jevons MP (1961) "Cellbenin"-resistant staphylococci. *Brit Med J* 1:124-125
- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K (2006) A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1549-1555
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth HN, Etienne J, Hiramatsu K (2007) Combination of multiple PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: Rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 51:264-274
- Lina G, Plémsant Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MD, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29:1128-1132
- Matsubashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, Ubukata K, Yamashita N, Kono M (1986) Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 167:975-980
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitam JM, McAllister SK, Tenover FC (2003) Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database. *J Clin Microbiol* 41:5113-5120
- Menegotto F, González-Cabrero S, Lorenzo B, et al. (2012) Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital over a 4-year period: clonal replacement, decreased antimicrobial resistance, and identification of community-acquired and livestock-associated clones. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:332-337
- Milheiro C, Oliveira DC, de Lencastre H (2007) Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: "SCCmec IV multiplex". *J Antimicrob Chemother* 60:42-48

19. Monecke S, Coombs G, Shore AC, et al. (2011) A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6:e17936
20. O'Brien FG, Lin TT, Chong FN, et al. (2004) Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol* 42:3185-190
21. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, et al. (2002) Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 40:4289-4294
22. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H (2011) The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microb Drug Resist* 7:349-361
23. Oliveira DC, de Lencastre H (2002) Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2155-2161
24. Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2:180-189
25. Oteo J, Baquero F, Vindel A, Campos J, Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2004) Antibiotic resistance in 3113 blood isolates of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2000-2002). *J Antimicrob Chemother* 53:1033-1038
26. Oter JA, French GL (2010) Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 10:227-239
27. Pantosti A (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Front Microbiol* 3:127
28. Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P, Bautista V, Grundmann H, Campos J; EARSS Spain *spa*-typing Group (2009) Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus spa*-type 1067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4)-Ia* and the efflux pump genes *mrjA/mrjB*. *J Antimicrob Chemother* 63:21-31
29. Rivero-Pérez B, Alcoba-Florez J, Méndez-Álvarez S (2012) Genetic diversity of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Tenerife Island, Spain. *Infect Genet Evol* 12:586-590
30. Robinson DA, Enright MC (2003) Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3926-3934
31. Schuenck RP, Nouir SA, Winter Cde O, Cavalcante FS, Scotti TD, Ferreira ALP, Giambiagi-de Marval M, dos Santos KRN (2009) Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCC_{mec} IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:434-441
32. Trnčíková T, Hraňková V, Oravcová K, Pangallo D, Kacelíková E (2009) Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food using selective enrichment and real-time PCR targeting a new gene marker. *Food Anal Methods* 2:241-250
33. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9:978-984
34. Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, Trincado P, Boquete T, Pérez-Vázquez M, Marín M, Bouza E; Spanish Group for the Study of *Staphylococcus* (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol* 47:1620-1627
35. Vindel A, Trincado P, Gómez E, Cabrera R, Boquete T, Solá C, Valdezate S, Saez-Nieto JA (2006) Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol* 44:266-270
36. Wang JT, Fang CT, Chen YC, Wu CL, Chen ML, Chang SC (2007) *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* in MRSA, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 13:494-497

Sección 3.2.2

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring *mecC* in Livestock, Spain

3.2

Jaime Ariza-Miguel¹, Marta Hernández¹, Isabel Fernández-Natal^{2,3} y David Rodríguez-Lázaro^{1,4}

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, C.P. 47071 Valladolid, Spain; ²University Hospital of León, Spain, ³Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, ⁴Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Publicado en *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. Vol. 52, 4067-4069

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring *mecC* in Livestock in Spain

Jaime Ariza-Miguel,* Marta Hernández,* Isabel Fernández-Natal,^{3,4} David Rodríguez-Lázaro^{3,4}

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain¹; Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain²; Institut of Biomedicine (IBROMED), University of León, León, Spain³; University of Burgos, Burgos, Spain⁴

We report for the first time *mecC*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*mecC*-MRSA) in livestock in Spain. One isolate (sequence type 130) was found in milk samples among 601 *S. aureus* isolates obtained from 229 dairy sheep farms. This finding highlights the potential for zoonotic transmission of *mecC*-positive MRSA and the need for surveillance programs to monitor its presence and clonal evolution.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a leading cause of nosocomial infections ranging from mild skin and soft tissue infections to life-threatening diseases, such as septicemia, toxic shock syndrome, endocarditis, and necrotizing pneumonia. Resistance to methicillin is mediated by the presence of the *mecA* gene, which encodes an additional penicillin-binding protein, PBP2a, with only a poor affinity for β -lactam antibiotics. A homologous gene, *mecC* (formerly *mecA₃(GAS3)*), was recently described (1, 2). Because of its divergence from *mecA* (only 69% and 63% identity at the DNA and amino acid levels, respectively), many standard and commercial diagnostic methods fail to detect *mecC*-positive MRSA (*mecC*-MRSA), leading to inappropriate treatment and underestimations of the prevalence of MRSA in clinical and environmental settings.

Since then, *mecC*-MRSA isolates have been detected in 13 European countries (Austria, Belgium, Denmark, Finland, France, Germany, Norway, the Republic of Ireland, Spain, Sweden, Switzerland, The Netherlands, and the United Kingdom) and have been isolated from 14 animal species, including companion, livestock, and wildlife animals (3). Evidence has been presented for the zoonotic potential of *mecC*-MRSA lineages (4, 5). It is therefore important to monitor potential animal reservoirs for the presence of such lineages.

The presence of *mecC*-MRSA was recently reported for the first time in clinical and environmental settings in Spain (6–8), but the prevalence of *mecC*-MRSA in livestock and its potential routes of human transmission are unknown. Spain has the second highest number of sheep among the 28 European Union members and 20% of the total European sheep population (see <http://www.coag.org>). Here, we report our evaluation of the presence of *mecC*-MRSA in Spanish dairy sheep farms.

We performed a retrospective study for *mecC*- and *mecA*-positive MRSA among a collection of 601 *S. aureus* isolates obtained from bulk milk samples collected from 229 dairy sheep farms from August 2008 to July 2009. Up to three isolates per farm were analyzed. The farms sampled were in 10 provinces (Ávila, Burgos, Cáceres, León, Madrid, Palencia, Salamanca, Segovia, Valladolid, and Zamora) that are within the Spanish geographical area with the highest sheep milk production (60% of the nation's sheep milk production). Screening for the presence of *mecA* and *mecC* was performed by multiplex PCR (9) on confirmed *S. aureus*-positive colonies in Baird Parker medium. A sample from 1 (0.44%) of 229 farms (1 of 601 *S. aureus* isolates) contained *mecC*-

MRSA, and 3 (1.31%) farms (9 of 601 isolates) tested positive for *mecA*-MRSA. The characteristics of the MRSA isolates harboring *mecC* and/or *mecA* are detailed in Table 1. The rarity of *mecC*-MRSA observed in this study agrees with the findings of previous studies in European livestock (10). *mecC* has also been found occasionally in human MRSA infections in Europe; one report found *mecC*-MRSA in 0.06% to 2.8% of the isolates tested (3). A retrospective study in Spain recently identified five *mecC*-MRSA isolates among isolates collected from one hospital between 2008 and 2013. In the same work, retrospective screening for *mecC* among 5,505 human *S. aureus* isolates received during the same period at the Spanish National Reference Centre for *Staphylococci* revealed two additional *mecC*-MRSA isolates (0.036%) (6).

The antimicrobial susceptibility of each *mecA*- and *mecC*-positive MRSA isolate was tested for 22 antimicrobial agents by a microdilution method following the recommendations and MIC breakpoints of the 2013 EUCAST guidelines v3.1 (see http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf) (Table 1). The *mecC*-positive isolate was sensitive to all non- β -lactam antibiotics tested, as reported for other similar *mecC*-carrying isolates (3, 10). An interesting finding was that all *mecA*-MRSA isolates were resistant not only to β -lactams but also to tetracycline (Table 1). The *mecC* isolates belonging to clonal complex 130 (CC130) have not generally acquired further resistance determinants, although resistance to ciprofloxacin has been reported sporadically (11). This suggests that the lineage has not been extensively subjected to antibiotic selective pressure, consistent with its low prevalence in the clinical environment. Further studies to clarify this issue are required.

The genetic backgrounds of all the MRSA isolates were investigated by multilocus sequence typing (MLST) (6). The genetic struc-

Received 26 June 2014; Returned for modification 4 August 2014

Accepted 26 August 2014

Published ahead of print 1 September 2014

Editor: B. A. Forbes

Address correspondence to Marta Hernández, herandezmarta@gmail.com, or David Rodríguez-Lázaro, rdlazarod@gmail.com

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/JCM.01815-14

TABLE 1 Characteristics of *mecC*- and/or *mecA*-positive MRSA isolates from dairy sheep farms, Spain, 2008–2009

Resistance determinant	Farm code (no. of isolates ^a)	Date of isolation (mo/day/yr)	Region	MLST	SCC _{mec}	MRSA clone	Antibiotic resistance ^b
<i>mecC</i>	648 (1)	3/03/2009	Zamora	ST130	XI	ST130-MRSA-XI	β-Lactams only
<i>mecA</i>	741 (3)	4/07/2009	Palencia	ST398	V	ST398-MRSA-V	β-Lactams, Tet
<i>mecA</i>	1040 (3)	7/28/2009	Palencia	ST398	IVa	ST398-MRSA-IV	β-Lactams, Tet
<i>mecA</i>	1043 (3)	7/28/2009	Valladolid	ST398	V	ST398-MRSA-V	β-Lactams, Tet

^a Three isolates from each farm were analyzed.

^b The antibiotic panel included penicillin, oxacillin, amoxicillin-clavulanate, deprenocin, rifaximin, erythromycin, clindamycin, tricloplan, vancomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, neopterin, rifampin, tetracycline (Tet), folic acid, fosfomicin, nitrofurantoin, linezolid and co-trimoxazole.

ture of the staphylococcal cassette chromosome *mec* element (SCC_{mec}) and the presence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) virulence factor genes (*hukS*-PV and *hukF*-PV) were also determined (2, 12–14). MLST analysis revealed that the *mecC*-carrying isolate belongs to sequence type 130 (ST130) (CC130). Most *mecC*-MRSA isolates analyzed belong to CC130, irrespective of the geographic origin or the host from which they were recovered. ST425 has also been reported, but less frequently, and other genetic backgrounds have been described sporadically (3). Characterization of SCC_{mec} revealed that the *mecC* isolate harbored SCC_{mec} type XI, as previously reported for all *mecC*-MRSA isolates studied to date. PVL virulence genes were not detected, which was not surprising, as all tested *mecC*-MRSA strains have been negative for this virulence factor (3). These various observations suggest that *mecC*-MRSA is still rare in clinical and environmental settings and that this lineage has only limited genetic diversity. This is an interesting conclusion because although the lineage was first described in 2011, *mecC*-MRSA has been circulating freely for at least the last 35 years (1). MLST analysis indicated that the *mecA*-MRSA isolates belong to ST398, which is strongly associated with livestock, as it was recovered from pigs in several European countries. The *mecA*-MRSA isolates from farms 741 and 1043 harbored SCC_{mec} type V, and isolates from farm 1040 were of subtype IVa (Table 1). PVL virulence genes were not detected.

The zoonotic potential of *mecC*-MRSA has been formally demonstrated (4, 5). However, there is little information available about the role of livestock in the transmission of *mecC*-MRSA to humans (4), and there has been no evidence, until now, of the presence of this lineage in livestock in Spain. The two largest sheep populations in Europe are in the United Kingdom and Spain (see <http://www.coag.org>). A recent study found that 2.15% of dairy cattle farms in England and Wales were positive for *mecC*, but interestingly, no *mecC*-positive farms were found in Scotland (14). However, there are no studies about the prevalence of *mecC* MRSA on sheep farms in Europe. Our study is the first to detect *mecC*-MRSA in livestock (dairy sheep farms) in Spain. This study was retrospective, and the sampling was not performed following a formal randomization process, so the results cannot be directly interpreted for prevalence values; however, this information provides an overview and baseline values that can be used in prospective prevalence studies.

In conclusion, we report for the first time the presence of *mecC*-MRSA in livestock in Spain. Although this lineage seems to be rare (0.44% of farms tested), it is of particular public health relevance because of its zoonotic potential, its ability to cause life-threatening disease (4, 6), and our inability to detect it with standard testing procedures. This demonstration that *mecC*-MRSA is present in livestock in Europe, and now in Spain in particular, highlights the need for surveillance programs; the presence and

evolution of *mecC*-MRSA in animal and environmental reservoirs need to be monitored.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Union 7th Framework Programme under the project PROMISE (project number 265877).

We thank Bruno González-Zorn (Universidad Complutense de Madrid) for kindly providing *mecC*-MRSA-positive control samples.

REFERENCES

- García-Arreola I, Holden Lindsay MT, Webb H, Brown CR, Curran DF, Walpole MD, Brooks E, Pickard K, Teale DJ, Parkhill C, Bentley J, Edwards SD, Girvan G, Kearns EK, Pichon AM, Hill B, Larsen RL, Skov AR, Peacock RL, Maskell SJ, Holmes DJ, MA. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 11:595–603. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8).
- Shore AC, Deary EG, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, Ehrlich R, Coleman DC. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecL*, *mecR*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3765–3773. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00187-11>.
- Peterson GK, Harrison EM, Holmes MA. 2014. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22:42–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmic.2013.11.003>.
- Harrison EM, Peterson GK, Holden MT, Larsen I, Stegger M, Larsen AR, Petersen A, Skov RL, Christensen JM, Bak Zeuthen A, Heiberg O, Harris SR, Zadoks RN, Parkhill J, Peacock SJ, Holmes MA. 2013. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol. Med.* 5:509–513. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.20120413>.
- Petersen A, Stegger M, Heiberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR. 2013. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 19:E16–E22. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12036>.
- García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira I, Ballesteros C, Pita I, Alonso P, Vindel A. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:45–50. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt327>.
- Purrero MC, Valverde A, Fernández-Illario P, Díez-Guerrero A, Mateos A, Lavín S, Cantón R, Fernández-Garayzabal JF, Dominguez L. 2014. *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 20:899–901. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2005.130426>.
- Gómez P, González-Barrío D, Benito D, García JE, Viñuela J, Zaranza M, Ruiz-Fons F, Torres C. 2014. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:2061–2064. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku100>.
- Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. 2012. Rapid detection,

- differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{1G4210}*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:395–400. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x>.
10. Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. 2014. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J. Antimicrob. Chemother.* 69:598–602. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt417>.
 11. Cuny C, Leyer F, Strommenger B, Witte W. 2011. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC330 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS One* 6:e24360. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024360>.
 12. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kneiweth BN, Etienne J, Hiramatsu K. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mecC*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:264–274. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00163-06>.
 13. Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. 2007. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: "SCCmec IV multiplex." *J. Antimicrob. Chemother.* 60:42–48. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm112>.
 14. Lima G, Piémont Y, Godail-Garnat F, Bes M, Peter MG, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29:1128–1132. <http://dx.doi.org/10.1086/313461>.

Sección 3.2.3

Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* transmission

David Rodríguez-Lázaro^{1,2}, Jaime Ariza-Miguel¹, Marta Díez-Valcarce³, Isabel Fernández-Natal^{4,5}, Marta Hernández¹ y Jordi Rovira³

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid, Spain; ²Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain, ³Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain; ⁴Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain; ⁵Institute of Biomedicine (BIOMED), University of León, León, Spain

Publicado en *International Journal of Food Microbiology*. 2014. pii: S0168-1605(14)00420-6.



Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission



David Rodríguez-Lázaro^{a,b,*}, Jaime Ariza-Miguel^a, Marta Diez-Valcarce^c, Isabel Fernández-Natal^{d,e}, Marta Hernández^a, Jordi Rovira^c

^a Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid, Spain

^b Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

^c Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

^d Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain

^e Institute of Biomedicine (BIOMED), University of León, León, Spain

ARTICLE INFO

Available online 19 August 2014

Keywords:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
CA-MRSA
Food
Neglected route of transmission

ABSTRACT

The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food-producing animals has provoked a great concern in the presence of MRSA in associated foodstuff. In this study, we have assessed for the first time the presence of MRSA in food confiscated from non-EU flights. We performed a search for MRSA among 195 food samples confiscated from passengers on flights from twenty-one non-EU countries in 2012 and 2013. One hundred and seventeen meat samples of diverse animal origin (including antelope, beef, chicken, duck, guinea pig, pork, rodents, and turkey), 75 dairy products (74 cheeses and 1 butter) and 3 eggs were analyzed. All *S. aureus* were studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility testing. MRSA isolates were further characterized by multilocus sequence typing (MLST), SCCmec typing, and tested for the presence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) virulence factors. Overall, 66 food samples were positive for *S. aureus* (33.9%). Six *S. aureus* strains were MRSA (9.1%), all of them in flights from Bolivia (and 5 from the same passenger). Among methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) (60 out of 66 *S. aureus* strains), 44.1% were resistant to penicillin, 10.2% to tetracycline, 8.5% were resistant to aminoglycosides (amikacin and tobramycin) and 3.4% exhibited the M phenotype. MRSA isolates were sensitive to all non-β-lactam antibiotics tested. Smal-PFGE analysis provided 40 genotypes among the *S. aureus* isolates (three genotypes among the six MRSA). Five MRSA isolates belonged to ST8 and harboured SCCmec type IVc as well as PVL genes. One isolate belonged to ST1649, harboured SCCmec type IVc and tested negative for the presence of the PVL genes. In conclusion, in this study, we report for the first time the presence of CA-MRSA in food confiscated from non-EU flights: ST8/ST1649-MRSA-IV. These results confirm the illegal entrance of food as a neglected route of transmission as well as the dissemination of successful CA-MRSA lineages among countries via illegal foods. As a result, illegally imported food could play a role in the prevalence and evolution of MRSA clones in the community.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is an important cause of food poisoning; it is estimated that an average of 241,148 episodes of domestically acquired foodborne illnesses caused by *S. aureus* occurs in the United States (Scallan et al., 2011). In addition, it is a leading cause of nosocomial invasive infections ranging from mild skin and soft tissue infections to life-threatening diseases such as septicemia, endocarditis and necrotizing pneumonia (Lowy, 1998). *S. aureus* frequently harbours antibiotic resistance determinants, which complicate treatment and significantly

increase the associated costs. Currently, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is distributed worldwide and constitutes a major concern in human health because of its complex epidemiology and its ability to acquire novel antibiotic resistance mechanisms.

MRSA was first described as early as 1960, within a year after the inclusion of methicillin in the clinical practice to treat infections caused by the emergence of penicillin-resistant *S. aureus* (Jevons, 1961). Its presence was initially restricted to the clinical environment, but at the end of the past decade, the first cases of MRSA infections in the community were reported, affecting people who exhibited non-typical risk factors of hospital acquisition (Otter and French, 2010). MRSA isolates recovered from the community exhibit particular phenotypic and genotypic features such as distinctive genetic backgrounds, smaller staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types IV or V, a non-multiresistant antibiotic profile and often encode virulence factors such as the Panton-

* Corresponding author at: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería, Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, Valladolid, Spain. Tel.: +34 983 415233; fax: +34 983 410462.
E-mail address: rodrlaz@itacyl.com (D. Rodríguez-Lázaro).

Valentine leukocidin (PVL). Consequently, isolates recovered from the community were designated community-associated MRSA (CA-MRSA) to distinguish them from those present in the clinical settings, or hospital-associated MRSA (HA-MRSA). Recently, MRSA belonging to ST398 was observed to colonize pigs and people professionally exposed to pig-farming in several European countries (Voss et al., 2005; Witte et al., 2007). Later studies revealed the presence of that lineage in other food-producing animals, and therefore it was designated as livestock-associated MRSA (LA-MRSA). These findings revealed that companion, livestock and wildlife animals can play a major role as MRSA reservoirs.

The emergence of MRSA in food-producing animals has provoked a great concern in the presence of MRSA in associated foodstuff. The role of food as a vehicle of human MRSA colonization or infection is deemed to be low by the European Food Safety Authority (EFSA). However, foodborne MRSA infections have been formally demonstrated in several occasions (Jones et al., 2002; Kluytmans et al., 1995), and food should not be discarded as a route for transmission of successful IA- and CA-MRSA lineages. In this study, we have evaluated for the first time the presence of MRSA in food confiscated from non-EU flights at an international airport (Bilbao, Spain). This information provides an overview on the rate of MRSA importation via contaminated illegal food, consequently, defining a neglected route of transmission, as well as to reveal which clones are involved.

2. Materials and methods

2.1. Food samples and detection of *S. aureus*

A total of 195 food samples were confiscated from passengers on flights from twenty-one non-EU countries at the International Bilbao Airport, Spain (www.aeropuertodebilbao.net) from April 2012 to June 2013: 117 meat samples of diverse animal origin (including antelope, beef, chicken, duck, guinea pig, pork, rodents and turkey), 75 dairy products (74 cheeses and 1 butter) and 3 eggs. Samples were confiscated by the Border Authorities at the Border Inspection Post. The origin of the samples was wide: Africa–Equatorial Guinea (7) and Morocco (2), Central and South America–Argentina (8), Bolivia (36), Brazil (13), Colombia (4), Dominican Republic (6), Ecuador (19), Paraguay (6), Peru (29), Puerto Rico (2), and Venezuela (2), Asia–People's Republic of China (31), Nepal (1), and Turkey (5), Eastern Europe–Bosnia and Herzegovina (3), Georgia (4), Moldavia (10), Serbia (3), and Ukraine (3), Oceania Australia (1) and 1 sample from an unknown origin (flight came from Paris, France).

The detection of *S. aureus* was performed following ISO 6888-2 (ISO, 1999). *S. aureus* isolates were further confirmed by real-time PCR as previously described (Trnžiková et al., 2009). A positive colony with the correct morphology in Baird Parker agar was taken for further typing tests (MRSA biotype, antibiotic resistance and genetic typing).

2.2. Screening for the presence of MRSA

The presence of *mecA* and *mecC* in *S. aureus* isolates was tested by multiplex PCR as previously described (Stegger et al., 2012). *mecC* and *mecA* positive controls, as well as non-template controls were included in each run.

2.3. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was performed using the microdilution method following the recommendations and MIC breakpoints of the EUCAST guidelines 2013 v3.1 (www.eucast.org). Susceptibility to the following 20 antimicrobial agents was tested: penicillin, oxacillin, amoxicillin/clavulanate, daptomycin, erythromycin, clindamycin, tricoplanin, vancomycin, ciprofloxacin, levofloxacin,

amikacin, gentamicin, tobramycin, mupirocin, rifampin, tetracycline, fusidic acid, fosfomycin, linezolid and cotrimoxazole.

2.4. Characterization of the genetic background

Genetic characterization of *S. aureus* strains was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as previously described (McDougal et al., 2003). PFGE patterns were analyzed with *BioNumerics* v.6.6 (Applied-Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) to describe genetic relationships among isolates. Dendograms were constructed using the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm with 1.5% in the tolerance and optimization values. The Simpson index of diversity was calculated to assess the discriminative power of PFGE by using the Comparing Partitions website hosted at darwin.phylotree.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home.

Multilocus sequence typing (MLST) of MRSA strains was performed as described elsewhere (Enright et al., 2000). Allelic profiles obtained by MLST were assigned by comparing the results obtained with data available in the *S. aureus* MLST database hosted at saureus.mlst.net. Information on the MRSA was submitted to that database.

2.5. Typing and subtyping of the SCCmec element

The genetic structure of the SCCmec element was determined by multiplex-PCR as previously described (Kondo et al., 2007). It allows the discrimination of the SCCmec types I, II, III, IV, V and VI, as well as the variants IA and IIIA. SCCmec IV was further subtyped into 8 different subtypes, from IVa to IVh, by multiplex-PCR as previously described (Milheirico et al., 2007).

2.6. Detection of Panton–Valentine leukocidin virulence factors

We investigated the presence of the PVL genes (*lukS-PV* and *lukF-PV*) by conventional PCR as described by Lina et al. (1999). Reference strain ATCC 49775 was used as a positive control.

3. Results

3.1. Presence of *S. aureus* and MRSA in food samples confiscated at the EU point of entrance

Overall, 66 food samples were positive for *S. aureus* (33.9%): 39 cheeses (59.1%), 26 meat products (39.4%) and 1 egg (1.5%). The origin of the positive samples was widespread: Africa, Central and South America, China, and Eastern Europe, but the samples were mainly from Central and South America (Bolivia, 16; Peru, 12; Ecuador, 4; Paraguay, 2; Brazil, 2 and Colombia, 1). The mean *S. aureus* count was 2.82×10^6 CFU/g, ranging from 1.0×10^2 CFU/g in several samples to 9.2×10^7 CFU/g in one cheese from Ecuador (Fig. 1).

Six isolates were MRSA, harbouring the *mecA* resistance determinant (9.1%). The characteristics of the MRSA isolates are detailed in Table 1. Interestingly, all six MRSA were detected in flights from Bolivia. Five MRSA were recovered from the same passenger: four were identified in four different dried meat pieces and another in pork sausages. The sixth MRSA was identified in a cheese sample from a different passenger.

3.2. Antibiotic susceptibility of the *S. aureus* isolates

Antibiotic susceptibility testing revealed 10 resistance profiles (Table 2). Among the methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), 44.1% of the isolates were resistant to penicillin, 10.2% to tetracycline, 8.5% were resistant to aminoglycosides (amikacin and tobramycin) and 3.4% exhibited the M-phenotype. MRSA isolates were sensitive to all non-β-lactam antibiotics tested.



Fig. 1. *S. aureus* counts (log cfu/g) per food category. The number of samples in each category is indicated in Italics. (—) and (---) represent the M values—upper limit in the microbiological criteria—for pasteurized milk and raw milk, semi-hard and hard cheeses, respectively (EU regulation 2073/2005). The ICMSF also recommends an M upper limit value of 10^7 cfu/g for meat and poultry products (only for cooked products) (ICMSF, 2011a, 2011b).

3.3. Genetic characterization of the *S. aureus* isolates

Genetic characterization of the *S. aureus* isolated strains by Smol-PFGE provided a fingerprint pattern consisting on 12–17 DNA fragments of approximately 22–760 kbp (Fig. 2). Overall, 40 genotypes were observed resulting in a Simpson index of diversity of 0.977 (CI 95%; 0.965–0.990). Interestingly, the five MRSA isolates recovered from the same traveller showed related genotypes: the four isolates recovered from dried meat pieces exhibited the same fingerprint pattern, and the isolate obtained from pork sausages was closely related; showing 85.7% similarity. MRSA isolate from the second passenger exhibited a unique genotype (Fig. 2). Further characterization of MRSA isolates revealed that the five isolates recovered from the same passenger belonged to sequence type (ST) 8 and harboured SCCmec type IVc as well as PVL genes. Interestingly, SCCmec typing of the isolate recovered from the sausages was not possible; the multiplex PCR-2, which types the *meaA* gene complex class, gave a 2827 bp DNA fragment, consistent with type B, but multiplex PCR-1, which provides the *ccr* gene complex type, did not amplify. MRSA isolate recovered from the second traveller belonged to ST1649, harboured SCCmec type IVc and tested negative for the presence of the PVL genes.

4. Discussion

We report a study to assess the role of illegal entrance of food to Europe through international flights as a neglected route of transmission of *S. aureus* and particularly MRSA. One-third of the food samples (66 out of 195; 33.9%) were positive for *S. aureus*, and a significant number of strains (15 of 65; 23.1%) were resistant to two or more antibiotics

Table 2

Antibiotic resistance profiles of the *S. aureus* strains from confiscated foods from passengers of flights from eleven non-EU countries, 2012–2013.

Resistance profile	Antimicrobial agent ^a	Isolates	%
RP0	None	32	49.2
RP1	All β -lactams	0 ^b	9.2
RP2	PEN	16	24.6
RP3	TET	1	1.5
RP4	PEN, TET	1	1.5
RP5	PEN, (CIP) ^c	1	1.5
RP6	PEN, AMI, TOB	3	4.6
RP7	PEN, AMI, TOB, (TET)	2	3.1
RP8	PEN, ERY, TET	1	1.5
RP9	PEN, ERY, (TET)	1	1.5

PEN, penicillin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin; AMI, amikacin; TOB, tobramycin; ERY, erythromycin.

^a The MIC breaking points used were those indicated in the EUCAST guidelines 2013 v3.1 (www.eucast.org). It was not possible to use one of the strains for further typing (antibiotic resistance or PFGE).

^b Parentheses indicate intermediate resistance.

^c All six methicillin-resistant *S. aureus* isolates exhibited RPI.

(Table 1). Both findings highlight the potential (neglected) transmission of *S. aureus* via illegal entrance of food products and a serious concern in public health due to the circulation of multidrug resistant strains. Interestingly, the mean *S. aureus* CFU counts in the food samples was elevated (Fig. 1), representing more than 3 log over the established limits (M values) in EU regulation 2073/2005 for pasteurised cheeses and the ICMSF's recommendation for meat products (ICMSF, 2011a, 2011b). It can represent a source of food poisoning as some of the foods that were positive were not expected to be submitted to culinary procedures that can eliminate either the strains or the derived preformed toxins. On top of that, 6 strains were MRSA (9.1%). The emergence of MRSA in food-producing animals has elicited a major concern in the presence of this pathogen in associated foodstuff and its potential role as a MRSA reservoir. Many studies have identified the presence of MRSA in food samples of very diverse animal origin from different countries. The prevalence of MRSA in food greatly varies depending on the animal's origin and the country. It seems that while pork had the highest contamination rate in the USA and Canada (Pu et al., 2009; Weese et al., 2010), in the Netherlands and Denmark, the highest prevalence has been found in poultry (Ageron et al., 2012; de Boer et al., 2009; O'Brien et al., 2012). However, these differences could be due to different sampling strategies and more formal prevalence studies involving several countries should be conducted to confirm this hypothesis.

The role of food as a source of human *S. aureus* colonization or infection is considered to be low by the EFSA. However, foodborne outbreaks of MRSA infection have already been reported (Jones et al., 2002; Khytmans et al., 1995), and the role of food in the prevalence of CA-MRSA has been recently demonstrated (Ogata et al., 2012). Therefore, the potential role of food in the dissemination of successful MRSA lineages cannot be disregarded. Remarkably, the six MRSA isolates identified in this study were collected in food samples of flights from Bolivia, and belonged to successful clones of CA-MRSA: ST8-MRSA-IV and ST1649-MRSA-IV. ST1649-MRSA-IV has been rarely reported, but it

Table 1

Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates detected in food samples decommissioned on flights from eleven non-EU countries, 2012–2013.

Isolate	Sample	Flight origin	PFGE profile	ST (CC)	SCCmec	Resistance profile	PVL
LBMM 862	Dried meat	Bolivia	A	8 (8)	IVc	RP1	Yes
LBMM 863	Dried meat	Bolivia	A	8 (8)	IVc	RP1	Yes
LBMM 864	Dried meat	Bolivia	A	8 (8)	IVc	RP1	Yes
LBMM 865	Sausages	Bolivia	B	8 (8)	Unknown ^d	RP1	Yes
LBMM 868	Dried meat	Bolivia	A	8 (8)	IVc	RP1	Yes
LBMM 875	Cheese	Bolivia	C	1649 (8)	IVc	RP1	No

ST, sequence type; CC, clonal complex; PVL, Pantin–Valentine leucocidin virulence factors.

^d SCCmec was typed as previously described by Kondo et al. (2007). Multiplex PCR-2, which types the *meaA* gene complex class, gave a 2827 bp DNA fragment, consistent with type B. However, multiplex PCR-1, which provides the *ccr* gene complex type did not amplify.

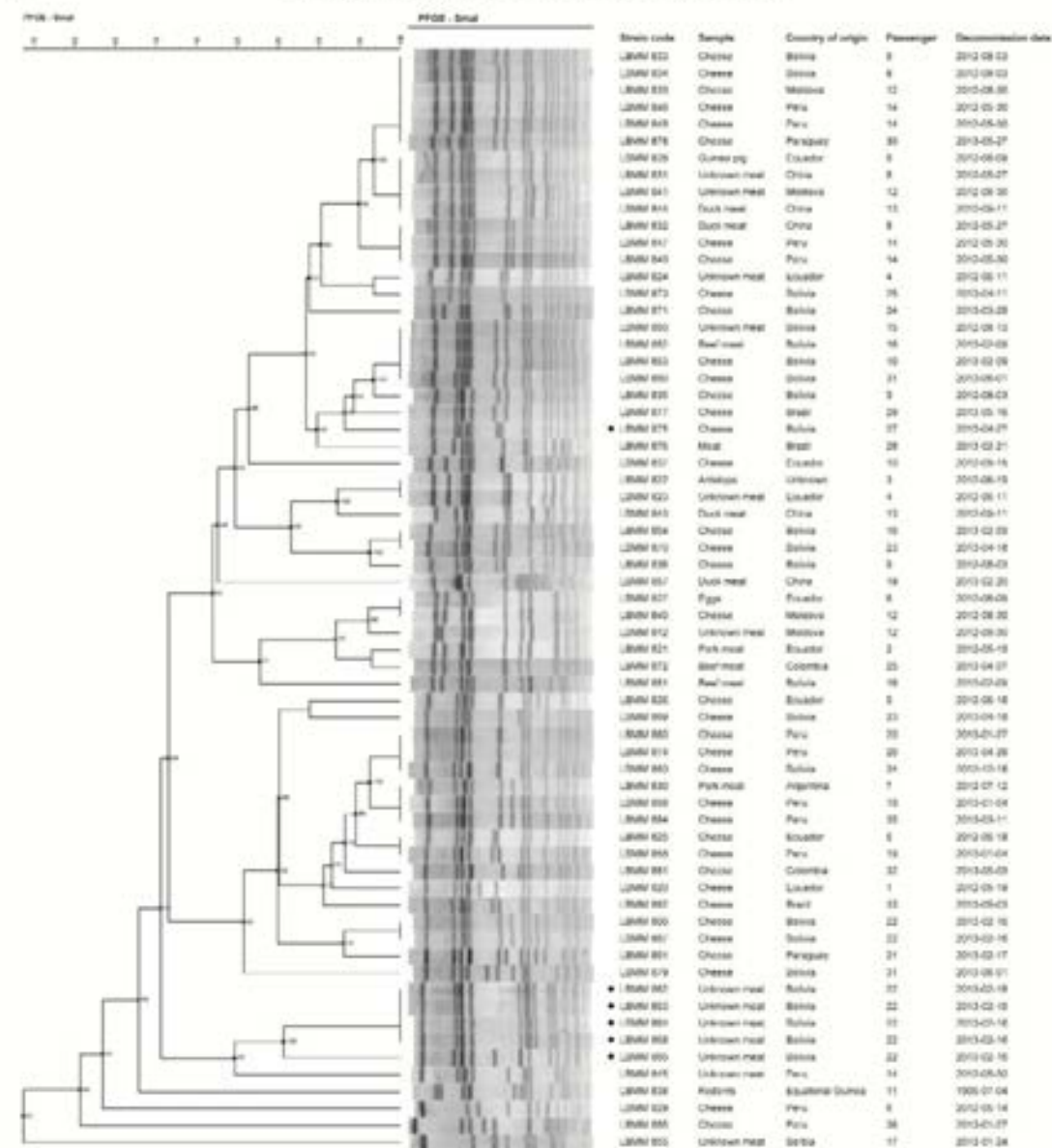


Fig. 2. Genetic relationships among *S. aureus* isolates based on comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles obtained with the restriction enzyme *Sma*I. Isolates were observed among a total of 195 food samples confiscated from passengers on flights from eleven non-EU countries, from April 2012 to June 2013. It was not possible to use one of the strains for further typing (antibiotic resistance or PFGE). Black dots to the left of the strain code identify the methicillin-resistant *S. aureus* strains. The dendrogram was produced by using a Dice similarity coefficient matrix with unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The scale bar indicates similarity values.

has been recently found in community settings in Bolivia and Peru and in healthy carriers in Spain (Bartoloni et al., 2013; Lozano et al., 2011). These findings point out to a human source of contamination caused by inappropriate handling of food. Interestingly, while most European studies have reported the presence of LA-MRSA clone ST398 in food of various animal origins (de Boer et al., 2009; Lozano et al., 2009), the presence of this clone in the USA and Canada still seems to be scarce,

and instead successful CA-MRSA clones are frequently reported (Bhargava et al., 2011).

In conclusion, in this study, we report the presence of successful CA-MRSA in food confiscated from non-EU flights: ST8/ST1649-MRSA-IV. This is the first time such an investigation has been performed. These results confirm the illegal entrance of food as a neglected route of transmission as well as the dissemination of successful MRSA lineages

among countries via illegal foods. As a result, illegally imported food could play a role in the prevalence and evolution of MRSA clones in the community.

Acknowledgements

This work was supported by the EU 7th Framework Programme under the project PROMISE (project number 265877). We wish to thank Subdelegación del Gobierno en Vizcaya for the technical assistance in the collection of the food samples, and Prof. Bruno Gonzalez-Zorn for kindly providing a positive control for the presence of MRSA harbouring *meC* gene.

References

Agrava, Y., Hasman, H., Cavaco, L.M., Pedersen, K., Aarstrup, F.M., 2012. Study of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. *Vet. Microbiol.* 157, 246–250.

Bartoloni, A., Paffrechhi, L., Fernandez, C., Mantella, A., Riccobono, E., Magnelli, D., Mannini, D., Stohmeyer, M., Bartalesi, F., Segundo, H., Monasterio, J., Rodriguez, H., Cabezas, C., Gotuzzo, E., Rossolini, G.M., 2013. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in urban and rural community settings in Bolivia and Peru. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e139–e142.

Bhargava, K., Wang, X., Donabedian, S., Zrems, M., de Rocha, L., Zhang, Y., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1135–1137.

de Boer, E., Zwartkruis-Nabuis, J.T., Wu, B., Huajdens, X.W., de Noering, A.J., Bosch, T., van Oostrom, R.A., Vila, A., Havelok, A.E., 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 52–56.

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

ICMSF, 2011a. Meat products in Microorganisms in foods 8: use of data for assessing process control and products acceptance. Springer, New York, p. 88.

ICMSF, 2011b. Poultry products in Microorganisms in foods 8: use of data for assessing process control and products acceptance. Springer, New York, p. 101.

ISO, 1999. ISO 6888-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. (Geneve, Switzerland).

Jevons, M.P., 1961. Celebesin-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1, 124–125.

Jones, T.F., Kellum, M.E., Porter, S.S., Bell, M., Schaffner, W., 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 82–84.

Kloppmann, J., van Leeuwen, W., Goossens, W., Hollis, R., Messer, S., Herwaldt, L., Bruising, H., Heck, M., Ros, J., van Leeuwen, N., 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1121–1128.

Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watarube, S., Kriewirth, R.N., Etienne, J., Hiramatsu, K., 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *meC* type assignment: rapid identification system for *meC*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 264–274.

Lina, C., Péronnet, Y., Godal-Garnot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J., 1999. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1126–1132.

Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532.

Lozano, C., López, M., Gómez-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., Zarazaga, M., 2009. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1325–1326.

Lozano, C., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Aspuez, C., Zarazaga, M., Torres, C., 2011. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 500–505.

McDougal, L.K., Soward, C.D., Klinger, G.F., Chaitam, J.M., McAllister, S.K., Tenover, F.C., 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5113–5120.

Milheirico, C., Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2007. Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome *meC* type IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: 'SCCmec IV multiplex'. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 42–48.

O'Brien, A.M., Hanson, B.M., Farina, S.A., Wu, J.Y., Simmering, J.E., Wardyn, S.E., Foeshey, B.M., Kulack, M.E., Wallinga, D.B., Smith, T.C., 2012. MRSA in conventional and alternative retail pork products. *PLoS One* 7, e30092.

Ogata, K., Narimatsu, H., Suzuki, M., Higuchi, W., Yamamoto, T., Taniguchi, H., 2012. Commercially distributed meat as a potential vehicle for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2797–2802.

Ottar, J.A., French, G.L., 2010. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 10, 227–239.

Pu, S., Han, F., Ge, B., 2009. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 265–267.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.

Stegger, M., Andersson, P.S., Knorr, A., Pichen, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, K., Larsen, A.E., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *meC*A or the new *meC*A homologue *meC*ALGA251. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 395–400.

Tršková, T., Hrušková, V., Oravcová, K., Pangallo, D., Kačliková, E., 2008. Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food using selective enrichment and real-time PCR targeting a new gene marker. *Food Anal. Methods* 2, 241–250.

Voss, A., Loeffler, F., Bakker, J., Klaisius, C., Wulf, M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1960–1966.

Wiese, J.S., Avery, B.P., Reid-Smith, R.J., 2010. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 338–342.

Witte, W., Storzmann, R., Stanek, C., Cazy, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals. *Central Europe. Emerg. Infect. Dis.* 13, 255–258.

Sección 3.2.4

Foods from black market at EU border as a neglected route of potential Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* transmission

Elena-Alexandra Oniciuc^{1a}, Jaime Ariza-Miguel^{2a}, Andrei-Sorin Bolocan¹, Marta Diez-Valcarce³, Jordi Rovira³, Marta Hernández²; Isabel Fernández-Natal^{4,5}, Anca Ioana Nicolau¹ y David Rodríguez-Lázaro^{2,6}

^aThese authors contributed equally to the work

¹Faculty of Food Science and Engineering, Dunarea de Jos University of Galati, Romania; ²Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain; ³Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Sciences, University of Burgos; ⁴Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain; ⁵Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León; ⁶Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Publicado en *International Journal of Food Microbiology*. 2014. pii: S0168-1605(14)00566-2



Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission



Elena-Alexandra Oniciuc^{a,1}, Jaime Ariza-Miguel^{b,1}, Andrei-Sorin Bolocan^a, Marta Diez-Valcarce^c, Jordi Rovira^c, Marta Hernández^d, Isabel Fernández-Natal^{d,e}, Anca Ioana Nicolau^a, David Rodríguez-Lázaro^{b,d,*}

^a Faculty of Food Science and Engineering, Danubius de Galati University of Galati, Romania

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain

^c Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

^d Department of Clinical Microbiology, Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain

^e Institute of Biomedicine (BIOMED), University of León, León, Spain

^f Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

ARTICLE INFO

Available online 22 November 2014

Keywords:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
LA-MRSA
Food
Black market
Border

ABSTRACT

The illegal entrance of foods to EU through black markets at the EU borders can constitute a neglected route of dissemination of foodborne pathogens, and in particular of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In this study, we have assessed the presence of MRSA in foods sold in a black market at an EU border (the south-east part of Romania, on the border with Republic of Moldavia). We performed a search for MRSA among 200 food samples collected from 2012 to 2013. All *S. aureus* were studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility testing. MRSA isolates were further characterized by multilocus sequence typing (MLST) and SCCmec typing, and tested for the presence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) virulence factors. Overall, 32 *S. aureus* isolates were recovered from 16 food samples (8%). One isolate detected in a pork lard sample was MRSA (0.5%). PFGE with the restriction enzyme *Sma*I revealed 12 genotypes among the 32 *S. aureus* isolates. The MRSA isolate belonged to sequence type 398, harbored SCCmec type V, tested negative for the presence of the PVL genes and was resistant to ciprofloxacin, tetracycline and ceftazolin, besides all β -lactams. Among 31 methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), 29% were resistant to penicillin, 9.7% to tetracycline and 3.2% to ciprofloxacin. In conclusion, in this study we report the presence of livestock-associated MRSA in foods sold in a black market at an EU border: ST398-MRSA-V. These results confirm the potential role of food in the dissemination of MRSA lineages among population, and the potential role of illegally introduced food to EU in the prevalence and evolution of MRSA clones in the community.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It is estimated that *Staphylococcus aureus* produced an average of 241,148 episodes of domestically acquired foodborne illnesses caused in United States (Scallan et al., 2011), representing an important cause of food poisoning. In addition, this foodborne pathogen cause nosocomial invasive infections ranging from mild skin and soft tissue infections to life-threatening diseases such as septicemia, endocarditis and

necrotizing pneumonia (Lowy, 1998). It has been estimated that around 30% of healthy human individuals are colonized by this opportunistic pathogen (Graveland et al., 2011). *S. aureus* frequently harbor antibiotic resistance determinants which complicate treatment and significantly increase the associated costs. Currently, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is distributed worldwide and constitutes a major concern in human health because of its complex epidemiology and its ability to acquire novel antibiotic resistance mechanisms.

MRSA was first described in 1960, within a year after the inclusion of methicillin in the clinical practice to treat infections caused by the emergence of penicillin-resistant *S. aureus* (Jevons, 1961). Its presence was restricted to the clinical environment initially, but at the end of the past decade first cases of MRSA infections in the community were reported affecting people who exhibited no typical risk factors of hospital acquisition (Otter and French, 2010). Until the beginning of this century, MRSA had been rarely reported in livestock. It was first described in 1975, and after that, only sporadic cases were reported in the following 25 years. From 2005 onwards, MRSA belonging to sequence type (ST)

Abbreviations: MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; SCCmec, staphylococcal cassette chromosome mec; PVL, Panton-Valentine leukocidin; CA-MRSA, community-associated MRSA; LA-MRSA, livestock-associated MRSA; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type.

* Corresponding author at: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería, Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 118, Valladolid, Spain. Tel.: +34 983 415233; fax: +34 983 410402.

E-mail address: nodiafntal@gmail.com (D. Rodríguez-Lázaro).

¹ These authors contributed equally to the work.

398 was observed to colonize pigs and people professionally exposed to pig farming in several European countries (Voss et al., 2005; Witte et al., 2007). Later studies revealed the presence of that lineage in other food-producing animals, and therefore was designated livestock-associated MRSA (LA-MRSA).

Emergence of MRSA in food-producing animals has provoked a great concern in the presence of MRSA in associated foodstuff due to the potential for dissemination in the population. The role of food as vehicle of human MRSA dissemination is deemed to be low by the European Food Safety Authority (EFSA). However, foodborne MRSA infections has been formally demonstrated in several occasions (Jones et al., 2002; Kluytmans et al., 1995), and food can be a successful route for transmission of MRSA lineages. In this study, we have evaluated the presence of MRSA in food illegally introduced and sold in a black market at an EU border (the southeast part of Romania, on the border with Republic of Moldova). This information provides an overview on the potential risk via foods introduced from non-EU countries as personal goods, which are then illegally sold to EU consumers, consequently defining a neglected route of transmission, as well as to reveal the role that it could play in the prevalence and dissemination of MRSA.

2. Material and methods

2.1. Sampling and bacterial isolates

A total of 200 samples were taken from July 2012 to February 2013 in a black market in Galati, Romania, a place close to the border with Republic of Moldova. The food samples were transported under refrigeration to the laboratory and their microbiological analysis started in the same day they were collected. The food samples were classified into four categories: milk and dairy products (36%), fish and fish products (31%), meat and meat products (20%), and 13% others (e.g. eggs, biscuits, spices). Sampling was done randomly and the food samples were tested for the presence of *S. aureus* in accordance with ISO 6888:2 (ISO, 1999) and confirmed by real-time PCR (Trnčíková et al., 2009).

2.2. Screening for the presence of MRSA

We assessed the presence of *mecA* and *mecC* in all *S. aureus* isolates by multiplex PCR as previously described (Stegger et al., 2012). *mecC* and *mecA* positive controls, as well as non-template controls were included in each run.

2.3. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was performed by the microdilution method following the recommendations and MIC breakpoints of the CLSI guidelines (2012). Susceptibility to the following 20 antimicrobial agents was tested: penicillin, oxacillin, amoxicillin/clavulanate, daptomycin, cefazolin, erythromycin, clindamycin, teicoplanin, vancomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, mupirocin, rifampin, tetracycline, fusidic acid, fosfomicin, linezolid and cotrimoxazole.

2.4. Genetic fingerprinting

Genetic characterization of all isolated *S. aureus* was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as previously described (McDougal et al., 2003). PFGE patterns were analyzed with Bionumerics v.6.6 (Applied-Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) to describe genetic relationships among isolates. Dendrograms were constructed using the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm with 1% in the tolerance and optimization values. The Simpson's index of diversity was

calculated to assess the discriminative power of PFGE by using the Comparing Partitions website hosted at <http://darwin.phylolab.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home>.

Multilocus sequence typing (MLST) of MRSA was performed as described elsewhere (Enright et al., 2000). Allelic profiles were assigned in the *S. aureus* MLST database hosted at <http://saureus.mlst.net/>. Information of the MRSA was submitted to that database.

2.5. Typing and subtyping of the SCCmec element

We determined the genetic structure of the SCCmec element by multiplex-PCR as previously described (Kondo et al., 2007). This molecular method allows the discrimination of the SCCmec types I, II, III, IV, V and VI, as well as the variants IA & IIA.

2.6. Detection of Pantone–Valentine leukocidin virulence factors

We investigated the presence of the PVL genes (*lukS-PV* & *lukF-PV*) by conventional PCR as described by Lina et al. (1999). Reference strain ATCC 49775 was used as positive control.

3. Results and discussion

The emergence of MRSA in food-producing animals has elicited a great concern in the last decade on the potential role of foods in the dissemination of MRSA lineages. Consequently, many studies have assessed the presence of this pathogen in food samples from different countries and animal origins. Prevalence of MRSA in foodstuff greatly varies depending on the animal and the country of origin. Thus, while pork showed the highest contamination rate in the USA and Canada, poultry did in the Netherlands and Denmark (Bhargava et al., 2011; Kluytmans, 2010). In this study we analyzed 200 food samples from a black market in Galati, Romania, a place close to the border with Republic of Moldova, assessing the presence of MRSA in foods illegally introduced and sold in a black market closed to an EU border. Crossing the Romanian border with food is allowed just for low amounts as personal goods on distances that do not overpass 50 km, but very often these foods are illegally sold in black markets. There are 9 border crossings between Romania and Republic of Moldova and 5 Romanian cities situated at distances that are in accordance with the Romanian law 10/2010. In each of those cities, there are one or two markets where Moldavians are coming daily to sell foods. Food products sold in such places are not coming only from Moldova, but also from Ukraine, Bulgaria and Russia. Those market are organized to sell fresh fruits and vegetables and do not have facilities for refrigeration. Despite the fact that local authorities installed adverts saying that food of animal origin is forbidden to be sold and make periodical controls of the activity taking place in these markets, eggs, fish and fish products, milk and dairy products, meat and meat products are sold daily. It is difficult to estimate the amounts of food from non-EU countries entering in that way, but the frequency of this phenomenon is constant and high. Furthermore, Reg (CE) 206/2009 regarding the introduction in the EC of personal foodstuff of animal origin bans the introduction of meat, milk and derived foodstuff if they are not from EU-countries or Croatia, Faeroe Islands, Greenland or Ireland.

Overall, 32 *S. aureus* isolates were recovered from 16 confiscated food samples (8%): 8 milk and dairy products, 5 fish products and 3 meat samples. Among them, one isolate (0.5%) recovered from pork larid sample was MRSA as harbored the *mecA* resistance determinant. None isolate harbored the *mecC* homologue. Genetic characterization of all 32 *S. aureus* by Smal-PFGE provided a fingerprint pattern consisting on 13–17 DNA fragments of 20–670 kbp, approximately. Twelve genotypes were observed resulting in a Simpson's Index of Diversity of 0.909 (CI 95% 0.854–0.963), but no relationship among the pulsotype and the sample type or the date of confiscation was observed.

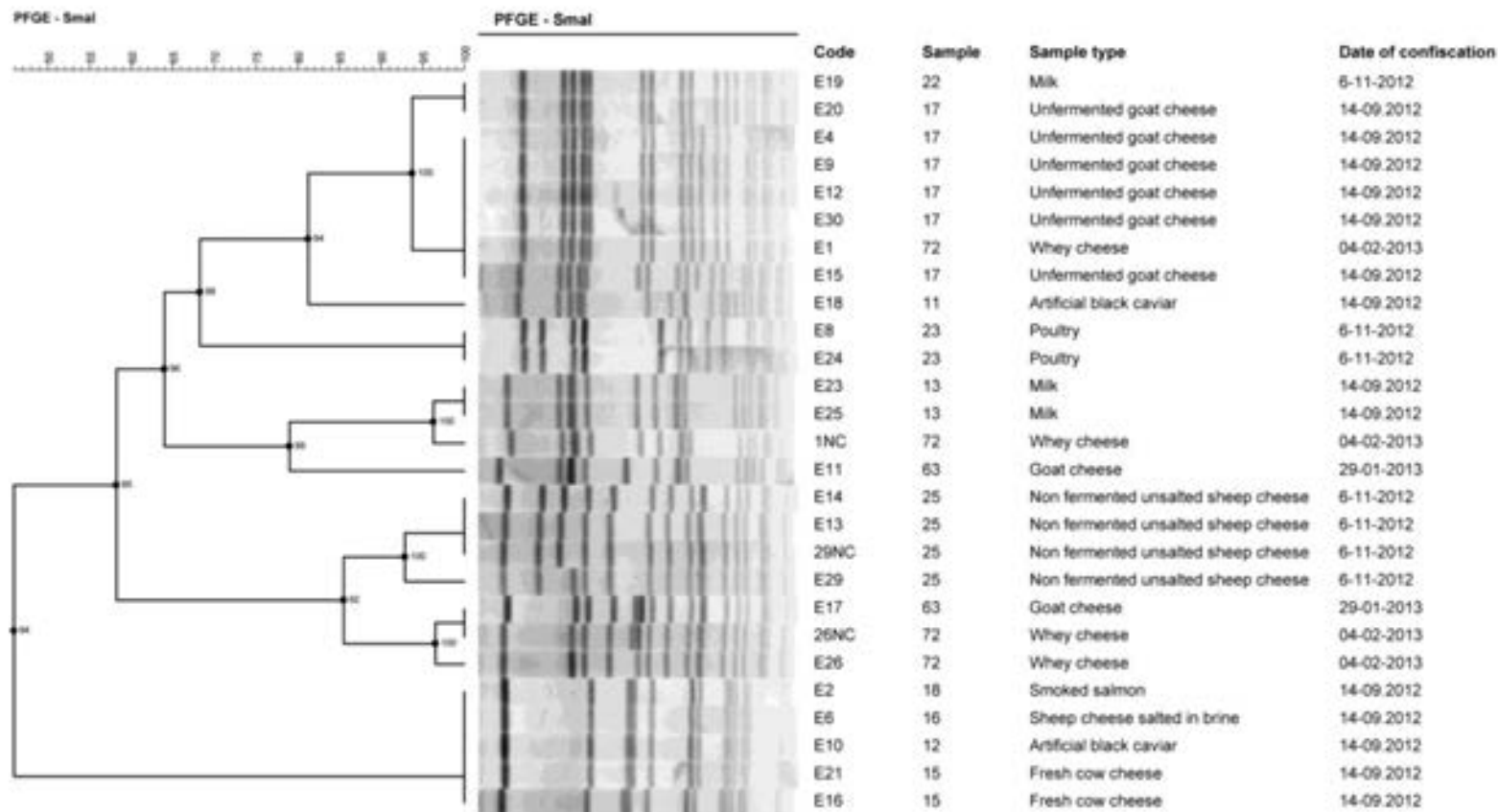


Fig. 1. Genetic relationships among 27 *Staphylococcus aureus* isolates based upon comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles obtained with the restriction enzyme *SmaI*. Isolates were observed among a total of 200 food samples confiscated in a black market in Romania, from July 2012 to March 2013. The dendrogram was produced by using a Dice similarity coefficient matrix with unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The scale bar indicates similarity values.

Note that in some cases isolates obtained from the same sample showed different subtypes, though most of them were closely related (Fig. 1). Five isolates, including the MRSA isolate, were not typeable by SmaI-PFGE suggesting that they belonged to sequence type (ST) 398, since it has been previously demonstrated that this lineage shows an unusual resistance to digestion by SmaI (Chung et al., 2000). Indeed, further characterization of MRSA isolate confirmed that it belonged to ST398, harbored SCCmec type V and tested negative for the presence of the PVL genes. Antibiotic susceptibility testing revealed 5 resistance profiles (Table 1). Overall, 19 strains (59.4%) were fully susceptible to all antibiotics tested. However, the MRSA isolate was not only resistant to all β -lactams but also to ciprofloxacin, tetracycline and ceftazidime. Among the methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), 9 strains (28.1%) were resistant to penicillin, 3 strains (9.7%) to tetracycline and 1 strain (3.2%) to ciprofloxacin (Table 1).

We found a relative low percentage of foods contaminated with *S. aureus* (8%), and only one isolate was MRSA (0.5%); ST398-MRSA-V. However, this isolate was multidrug resistant not only to β -lactams but also to other three antibiotics widely used in chemotherapy (Table 1). The MRSA recovered from food are not necessarily related to that present in the animal of origin, and two types of genetic backgrounds can be found in foods: community-associated MRSA (CA-MRSA) present in food due to a human source of contamination by inappropriate handling, or LA-MRSA via contamination of carcasses during slaughtering of MRSA-positive animals. Interestingly, while most European studies have reported the presence of LA-MRSA clone ST398 in food of various animal origins (de Boer et al., 2009; Lozano et al., 2009) as in the case of our study, it seems that the presence of this clone in the USA and Canada is still scarce, and instead successful CA-MRSA clones are frequently reported (Bhargava et al., 2011). The results of a recent study monitoring the presence of MRSA in illegally imported food confiscated to passengers of non-EU flights in a Spanish Airport, which also represents a neglected route of transmission of MRSA to EU, corroborated that scenario; the MRSA obtained were from the American continent (Bolivia) and belonged to two successful clones of CA-MRSA (ST8 and ST1649) (Rodríguez-Lázaro et al., 2015). In both cases it seems clear that food can play a role in the dissemination of successful CA- or LA-MRSA into general population. Indeed, foodborne outbreaks of MRSA infection have been reported (Jones et al., 2002; Klytzmans et al., 1995), and the role of food in the prevalence of MRSA has been recently demonstrated (Ogata et al., 2012). In this sense, there is a growing general consensus that the transmission route from environment to hospital involves not only humans and environmental bacteria, but also animals and food products (González-Zorn and Escudero, 2012; Spanu et al., 2012).

In conclusion, the results obtained in our study confirm the potential role of food in the dissemination of successful MRSA lineages, and define illegally introduced and sold food as a neglected route of MRSA dissemination, which can play a role in the prevalence and evolution of MRSA clones in the community.

Table 1
Resistance profiles of 32 *Staphylococcus aureus* isolates recovered in food samples sold at a black market in the southeast border of Romania, 2012–2013.

Resistance profile	Antimicrobial agent ^a	Isolates	%
RPO	None	19	59.4
RP1	PEN	0	28.1
RP2	TET	2	6.3
RP3	TET, CIP	1	3.1
RP4	All β -lactams, TET, (CIP)	1 ^b	3.1

PEN, penicillin; TET, tetracycline; CIP, ciprofloxacin.

^a Parentheses indicate intermediate resistance.

^b Methicillin-resistant *S. aureus* isolate.

Acknowledgments

This work was supported by the EU 7th Framework Programme under the project PROMISE (project number 265877). We thank Dr. Bruno Gonzalez-Zorn for kindly provide a positive control for the presence of MRSA harboring *meC* gene.

References

- Bhargava, K., Wang, X., Donabedian, S., Zervou, M., de Rocha, L., Zhang, Y., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1135–1137.
- Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Aires de Sousa, M., Carrico, T., Cozart, C., Coru, A., Couls, I., Dzingirga, A., Gniadrowski, M., Goring, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Macchese, A., Mano, R., Melzer, O., Oliveira, D., Palacin, R., Sá-Leão, R., Santos Sanchez, I., Song, J.H., Tassios, P.T., Villar, P., Multicenter Project Collaborators, 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* 6, 189–198.
- CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eleventh Edition. CLSI, Wayne, USA.
- de Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, J.T., Wit, B., Huisdrem, X.W., de Neeling, A.J., Bosch, T., van Oosterom, R.A., Vila, A., Heuvelink, A.E., 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 52–56.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multicore sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1006–1015.
- González-Zorn, B., Escudero, J.A., 2012. Review article: Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int. Microbiol.* 15, 101–109.
- Graveland, H., Duim, R., van Duyleren, F., Heerdek, D., Wagenaar, J.A., 2011. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int. J. Med. Microbiol.* 1, 630–634.
- ISO, 1990. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – part 2: technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium (Geneve, Switzerland).
- Jones, M.P., 1961. Celebesin-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1, 124–125.
- Jones, T.F., KeHara, M.E., Porter, S.S., Bell, M., Schaffner, W., 2002. An Outbreak of Community-acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* II. *pp. 82–84*.
- Klytzmans, J.A., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or cause for complacency? *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 11–15.
- Klytzmans, J., van Leeuwen, W., Geessens, W., Hollis, R., Messer, S., Herwaldt, L., Bruining, H., Heck, M., Rint, J., van Leeuwen, N., 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by phage- and genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1121–1128.
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X.X., Watarabe, S., Kuroiwa, B.N., Etienne, J., Hiramoto, K., 2007. Combination of multiple PCRs for staphylococcal cassette chromosome *meC* type assignment: rapid identification system for *meC*, *crf*, and *mpa* differences in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 264–274.
- Lina, C., Pélissier, Y., Goddard-Gent, F., Bes, M., Penar, M.D., Gauduchon, V., Vandendriessche, F., Etienne, J., 1998. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1128–1132.
- Loay, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532.
- Lozano, C., López, M., Gilmer-Sanz, E., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., Zarazaga, M., 2009. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 1325–1326.
- McDougal, L.K., Storz, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., Tenover, F.C., 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5113–5120.
- Ogata, K., Narimatsu, H., Sanaki, M., Higuchi, W., Yamamoto, T., Taniguchi, H., 2012. Commercially distributed meat as a potential vehicle for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2797–2802.
- Ottar, J.A., French, G.L., 2010. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 10, 227–239.
- Rodríguez-Lázaro, D., Ariza-Miguel, J., Díez-Vázquez, M., Fernández-Natal, E., Hernández, M., Bovera, J., 2015. Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int. J. Food Microbiol.* 209, 28–32.
- Scallan, E., Hoelzl, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15.
- Spanu, V., Spanu, C., Vidin, S., Coroa, F., Scarano, C., De Santis, E.P.L., 2012. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 53–57.
- Stegger, M., Andersen, P.S., Kiarri, A., Pichon, B., Holmes, M.A., Edwards, G., Laurent, F., Teale, C., Skov, R., Larsen, A.R., 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *meC*A or the new *meC*A homologue *meC*ALGA251. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 395–400.

- Tržičková, T., Hrušková, V., Osovská, K., Pangallo, D., Kačíková, E., 2009. Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food using selective enrichment and real-time PCR targeting a new gene marker. *Food Anal. Methods* 2, 241–250.
- Voss, A., Loeffler, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wu, M., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965–1966.
- Wiese, W., Strassmeyer, B., Stanek, C., Cury, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 255–258.

Web References

- Comparing partitions website <http://darwin.phylowiz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home>. Last accessed 10 July 2014.
- Staphylococcus aureus* multilocus sequence typing database. <http://saurns.mshz.net/>. Last accessed 10 July 2014.



*Listeria
monocytogenes*

Sección 3.3

Sección 3.3.1

Molecular Epidemiology of Invasive Listeriosis due to *Listeria monocytogenes* in a Spanish Hospital over a Nine-Year Study Period, 2006-2014

Jaime Ariza-Miguel¹, María Isabel Fernández-Natal^{2,3}, Francisco Soriano⁴, Marta Hernández¹, Beatrix Stessl⁵ y David Rodríguez-Lázaro^{1,6}

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain; ²Department of Clinical Microbiology, Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain; ³Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León, Spain; ⁴Public Health, School of Physiotherapy ONCE, Madrid, Spain; ⁵Institute of Milk Hygiene, Milk Technology and Food Science, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria; ⁶Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Research Article

Molecular Epidemiology of Invasive Listeriosis due to *Listeria monocytogenes* in a Spanish Hospital over a Nine-Year Study Period, 2006–2014

Jaime Ariza-Miguel,¹ María Isabel Fernández-Natal,^{2,3} Francisco Soriano,⁴ Marta Hernández,¹ Beatrix Stessl,⁵ and David Rodríguez-Lázaro^{1,6}

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain

²Department of Clinical Microbiology, Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain

³Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León, Spain

⁴Public Health, School of Physiotherapy ONCE, Madrid, Spain

⁵Institute of Milk Hygiene, Milk Technology and Food Science, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

⁶Microbiology Section, Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Correspondence should be addressed to María Isabel Fernández-Natal; ifernandeznatal@gmail.com and David Rodríguez-Lázaro; rodlazada@gmail.com

Received 18 April 2015; Revised 23 June 2015; Accepted 1 July 2015

Academic Editor: Milton O. Moraes

Copyright © 2015 Jaime Ariza-Miguel et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We investigated the pathogenicity, invasiveness, and genetic relatedness of 17 clinical *Listeria monocytogenes* strains isolated over a period of nine years (2006–2014). All isolates were phenotypically characterised and growth patterns were determined. The antimicrobial susceptibility of *L. monocytogenes* isolates was determined in E-tests. Invasion assays were performed with epithelial HeLa cells. Finally, *L. monocytogenes* isolates were subtyped by PFGE and MLST. All isolates had similar phenotypic characteristics (β -haemolysis and lecithinase activity), and three types of growth curve were observed. Bacterial recovery rates after invasion assays ranged from 0.09% to 7.26% (1.62 ± 0.46). MLST identified 11 sequence types (STs), and 14 PFGE profiles were obtained, indicating a high degree of genetic diversity. Genetic studies unequivocally revealed the occurrence of one outbreak of listeriosis in humans that had not previously been reported. This outbreak occurred in October 2009 and affected three patients from neighbouring towns. In conclusion, the molecular epidemiological analysis clearly revealed a cluster (three human cases, all ST1) of not previously reported listeriosis cases in northwestern Spain. Our findings indicate that molecular subtyping, in combination with epidemiological case analysis, is essential and should be implemented in routine diagnosis, to improve the tracing of the sources of outbreaks.

1. Introduction

Listeria monocytogenes is an emerging foodborne pathogen capable of infecting animals and humans. It is the leading cause of death in reported cases of food poisoning [1]. The groups at highest risk of listeriosis are pregnant women, in whom this infection may cause late miscarriage or stillbirth, neonates, immunocompromised individuals, and the elderly, in whom it causes mostly septicaemia and meningoen- cephalitis [2, 3]. The incidence of listeriosis has recently

been reported to be higher among the elderly than in other groups [4, 5]. The case-fatality rate is still increasing (20–30%) worldwide, despite antibiotic treatment [6, 7]. Noninvasive listeriosis is often associated with febrile gastroenteritis and sometimes with cutaneous forms, as observed in veterinary surgeons coming into direct contact with aborted foetuses from livestock [8, 9]. The disease is usually vertically transmitted during pregnancy or acquired by the consumption of contaminated food, particularly fresh and ready-to-eat products that are not heated before consumption [10, 11].

A European Food Safety Authority (EFSA) baseline study focusing on ready-to-eat (RTE) food indicated that smoked and marinated fish products carried the highest risk of *L. monocytogenes* contamination [1]. In the US, poultry meat was found to be responsible for most (63%) fatal cases of listeriosis [12]. A recent study showed that foodborne outbreaks in hospitalised patients on immunosuppression treatments were linked to hospital food (e.g., sandwiches and celery) [5].

L. monocytogenes consists of four discrete evolutionary lineages (I–IV) and 13 serotypes [13, 14]. Historically, diverse molecular typing methods, including PFGE, multilocus enzyme electrophoresis, and ribotyping, have been used to study the genetic diversity of the isolates involved in international outbreaks. Thus, epidemic clones (ECs) involved in geographically and temporally distant outbreaks or in large, single outbreaks have been defined [15]. In the last decade, ECs have been redefined on the basis of multi-virulence-locus sequence typing (MVLST), which is based on the analysis of six to eight genes [16]. Multilocus sequence typing (MLST), which is based on the analysis of seven housekeeping genes [17], has also been used for the definition of clonal groups. Sequence types (ST) are defined as a unique combination of MLST allele designations used in the MLST scheme, and clonal complexes (CC) are defined as groups of STs differing by only one housekeeping gene from other members of the group. An analysis of *L. monocytogenes* isolates from five continents by MLST demonstrated the existence of globally successful genetic groups [18]. Seven “epidemic clones” (ECs) have been defined by MVLST, each descended from a common ancestor with a similar temporal and spatial virulence profile [16, 17, 19, 20]. EC1, corresponding to the CC1 identified by MLST, and ECIV (CC2) appear to be cosmopolitan clones involved in many outbreaks [16]. *L. monocytogenes* sequence type (ST) 6 (ECII) has been implicated in human meningitis with a fatal outcome [21]. *L. monocytogenes* serogroups most frequently associated with clinical cases are serotype 4b, followed by 1/2b (genetic lineages I and III), and 1/2a (genetic lineage II) [14]. *L. monocytogenes* serotype 1/2a is increasingly being isolated from cases of invasive listeriosis in Italy and Switzerland [21–24]. A link between isolates obtained from patients and isolates obtained from smoked fish has been reported in Scandinavian countries (Sweden, Norway, and Finland) and in eastern Spain [25–29]. Furthermore, actual outbreaks of listeriosis have been linked to *L. monocytogenes* serotype 1/2a and seem to be particularly prevalent in cheese processing plants [10, 30–33].

The incidence of listeriosis in Spain has increased steadily over the last decade. There were a reported 0.56 cases per 100,000 inhabitants from 2001 to 2007 [34]. Martínez et al. [35] reported 0.67 invasive listeriosis cases per 100,000 inhabitants in Valencia during the 2008–2010 period. In 2012, the notification rate for listeriosis cases in Spain was the second highest of any member state of the EU (0.93, versus an EU-wide rate of 0.41 per 100,000 inhabitants) [6].

Mortality rates are high for invasive listeriosis, justifying the use of combinations of molecular subtyping tools for the identification of clusters associated with outbreaks, tracing the source of the outbreak, and preventing further

transmission. These methods were therefore combined in a retrospective study focusing on invasive listeriosis cases in León (2006–2014) and involving *in vitro* virulence testing.

2. Materials and Methods

2.1. Case Definition. All patients suffering from meningitis, bacteraemia, or infection during pregnancy were considered as potential cases of listeriosis. The infection was confirmed by the isolation of *L. monocytogenes* from a normally sterile site.

2.2. Description of the Hospital. The study has been carried out in the “Complejo Asistencial Universitario de León” (CAULE), a facility with about 800 beds located in the province of León in Northwest Spain. It serves an urban population of over 130,000 inhabitants and the total population of the metropolitan area has been estimated at over 490,000.

2.3. Clinical Cases. In total, there were 17 clinical cases of listeriosis at the CAULE from 2006 to 2014. These cases occurred in one premature newborn and 11 male and five female patients, aged from 31 to 89 years. In total, 11 *L. monocytogenes* isolates were recovered from blood cultures, and six were recovered from cerebrospinal fluid (CSF). In some patients *L. monocytogenes* isolates were recovered from both blood cultures and CSF ($n = 2$) or from peritoneal fluid (PF; $n = 1$) or synovial joint fluid (JF; $n = 1$) (Table 1).

2.4. Isolation and Confirmation of *L. monocytogenes*. Clinical isolates of *L. monocytogenes* were streaked onto two selective chromogenic agar plates: ALOA (Agar Listeria Ottaviani & Agosti) medium (CHEMUNEX, Bruz Cedex, France) and RAPID *L. mono* agar (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Ca, US). The bacteria were subjected to Gram staining and catalase and Christie Atkins Munch-Petersen (CAMP) tests. The collection strain *S. aureus* CECT 828 was used in the CAMP test, as recommended, to enhance *L. monocytogenes* haemolysis.

Each of the *L. monocytogenes* isolates was confirmed biochemically (API Coryne V.2.0; bioMérieux, Marcy l’Étoile, France) and by real-time PCR methods for differentiating between *Listeria* species [36–39]. The *L. innocua* CECT910, *L. monocytogenes* ITA1315, and *L. ivanovii* ATCC19119 reference strains served as positive controls in the PCR assays.

2.5. *L. monocytogenes* Growth Curves. Growth curves were determined by culture in brain heart infusion (BHI, Oxoid, Hampshire, UK), with the measurement of optical density at 600 nm in a Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer, Massachusetts, USA) over a 24-hour period of incubation at 37°C, with shaking at 180 rpm.

2.6. Antimicrobial Susceptibility Testing. The susceptibility of 17 clinical *L. monocytogenes* isolates to 16 antimicrobial agents was determined by E-tests on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% sheep’s blood, incubated under an atmosphere of ambient air at 35°C, with reading of the plates

TABLE I: Clinical cases of invasive *Listeria monocytogenes* infections in a Spanish hospital over a nine-year study period, 2006–2014.

Sample	Sex	Age	Date	Source	Clinical diagnosis	Antibiotic treatment	Province	PFGE pulsotype	MLST ST
Genetic lineages I and III									
1	M	60	Jun. 06	CSF	Meningoencephalitis	Ampicillin	León	H	1
8	M	44	Oct. 09	CSF	Meningoencephalitis	Ampicillin/gentamicin	León	D	1
9 [†]	F	68	Oct. 09	Blood culture/CSF	Meningoencephalitis/sepsis	Ampicillin/gentamicin/vancomycin	León	D	1
10	M	NB	Oct. 09	Blood culture	Sepsis	Ampicillin/gentamicin	Zamora	D	1
7	M	76	Feb. 09	Blood culture/JF	Arthritis/bacteraemia	Ampicillin/gentamicin	León	G	2
6	M	83	Jan. 09	Blood culture	Bacteraemia	Ampicillin/gentamicin	León	E	3
11	M	50	Feb. 10	Blood culture	Sepsis	Ampicillin/gentamicin	Asturias	A	3
15	M	82	Jul. 13	CSF	Meningoencephalitis	Ampicillin/gentamicin	León	L	4
13	F	89	Feb. 12	Blood culture	Sepsis	Ampicillin/gentamicin	León	B	87
4 ^{†*}	F	31	Apr. 07	Blood culture	Fever in pregnant woman	Amoxicillin clavulanate	León	F	389
Genetic lineage II									
5	M	50	Dec. 08	CSF	Meningoencephalitis	Ampicillin/gentamicin	León	K	9
2	M	84	Sep. 06	Blood culture/PF	Peritonitis/sepsis	Ampicillin/vancomycin	León	I	16
3	M	40	Feb. 07	CSF	Meningoencephalitis	Ampicillin/gentamicin	León	I	16
12	M	65	Apr. 10	Blood culture	Sepsis	Ampicillin/gentamicin	León	J	16
14	F	82	Jun. 12	Blood culture	Sepsis	Ampicillin/gentamicin	León	C	399
16	M	59	Feb. 14	CSF	Meningoencephalitis	Ampicillin/gentamicin	León	M	7
17	F	63	Feb. 14	Blood culture/CSF	Meningoencephalitis/sepsis	Ampicillin/gentamicin	León	N	8

* Foetal death. Full recovery of the mother; † Deceased.

PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; MLST, multilocus sequence typing; NB, premature newborn; CSF, cerebrospinal fluid; JF, joint fluid; PF, peritoneal fluid.

after 20–24 h. Susceptibility to antibiotics was interpreted applying the recommendations of the EUCAST for the antimicrobial susceptibility of *L. monocytogenes* [40]. The following antibiotics were tested: benzylpenicillin, ampicillin, imipenem, meropenem, erythromycin, clindamycin, gentamicin, vancomycin, daptomycin, linezolid, ciprofloxacin, moxifloxacin, tetracycline, tigecycline, rifampin, and cotrimoxazole.

2.7. Invasion Assays. We assessed the invasiveness of 17 clinical *L. monocytogenes* isolates in an epithelial HeLa cell culture assay, as previously described [41]. A well characterised clinical *L. monocytogenes* serovar 4b strain (P14) and its isogenic *prfA* gene deletion mutant ($\Delta prfA$) were included in the assay as controls. HeLa ATCC CCL-2 cells were maintained at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO₂. The invasiveness of each *L. monocytogenes* isolate was analysed in quadruplicate (2 independent invasion assays, with each isolate analysed in duplicate in each assay). Between passages 1 and 14, cell lines were maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM; Gibco, San Diego, United States) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% foetal bovine serum, and 1% nonessential amino acids. Bacteria were resuspended in plain Eagle's minimum essential medium and used to infect HeLa cells at a multiplicity of infection (MOI) of 20:1, with the exception of the $\Delta prfA$ mutant strain of *L. monocytogenes*, for which we used a MOI of 200:1.

2.8. Molecular Epidemiological Analysis. *L. monocytogenes* serogroups were defined according to a multiplex PCR targeting the specific target genes *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819*, *ORF2110*, and *Listeria* spp.-specific *prs* published by Doumith et al. [42] and amended by Leclercq et al. [43] for PCR IVb-VI. *L. monocytogenes* clinical isolates were genomically characterised by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with the restriction enzymes *Apal* and *AscI*, according to the standardised international protocol of PulseNet [44]. We analysed PFGE profiles with Bionumerics v.6.6 software (Applied-Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium), to describe the genetic relationships between isolates. Dendrograms were constructed with the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm. Tolerance and optimisation values were set to 15%, in accordance with the recommendations of Martin et al. [45]. Simpson's index of diversity, which measures the probability of two unrelated strains sampled from the test population being placed in different typing groups [46], was calculated to compare the discriminative power of PFGE, via a website comparing partitions [47]. Fingerprints were interpreted according to the recommendations for foodborne pathogens [48]. Multilocus sequence typing (MLST) was performed as described by Ragon et al. [17]. Allele types were assigned for seven housekeeping loci, *abcZ* (ABC transporter), *bgIA* (beta glucosidase), *cat* (catalase), *dapE* (succinyl diaminopimelate desuccinylase), *dat* (D-amino acid aminotransferase), *ldh* (L-lactate dehydrogenase), and *hkaA* (histidine kinase), and the resulting sequence types (STs) were determined and compared, with the Institute Pasteur *Listeria monocytogenes* MLST database [49]. Sequence types

(STs) were defined as a unique combination of MLST allele designations used in the MLST scheme, and clonal complexes (CC) were defined as groups of STs differing by only one housekeeping gene from other members of the group [17]. An allelic profile-based comparison, based on the use of a minimum spanning tree (MST) and the Pasteur Institute online tool, was performed to define the relationships between strains at the microevolutionary level.

2.9. Statistical Analysis. Statistical two-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate differences in invasive capacity between isolates, based on the 95% confidence interval and Bonferroni multiple comparison tests to assess the differences in greater depth (GraphPad Prism v5.0). The threshold *P* value for this test was set at 0.05.

3. Results

3.1. Patient Outcomes. The outcome was favourable after antibiotic treatment in 15 of the 17 patients. Progression was observed in case 4, a pregnant woman whose foetus died as a result of the infection. Patient 9 died after antibiotic treatment failure. Further information is provided in Table 1.

3.2. *L. monocytogenes* Isolation, Confirmation, and Growth Curves. All 17 clinical isolates were confirmed to be *L. monocytogenes* by phenotypic and genetic methods. β -haemolytic and lecithinase activities, at 24, 48, and 72 hours, were similar in all the clinical isolates. As expected, these activities were stronger in *L. ivanovii* ATCC19119, and *L. innocua* CECT910 displayed no activity. The isolates recovered from clinical cases 6 and 7 had specific growth patterns (GPs), reaching the exponential growth phase later than the other isolates (exponential growth phase from 5 to 12 hours and from 13 to 23 hours of incubation, resp.). The exponential phase in the other *L. monocytogenes* isolates began after about three hours and continued until about 6.5 hours of incubation. Representative growth curves for the isolates are shown in Figure 1.

3.3. Antimicrobial Susceptibility Testing. The antimicrobial susceptibility data for the 17 isolates tested are presented in Table 2. In the E-test method, all our isolates were found to be susceptible to benzylpenicillin, ampicillin, erythromycin, and cotrimoxazole. In 10 isolates, the MIC of meropenem was 0.38 to 0.75 mg/L. These isolates may be considered resistant, according to the strict criterion of the EUCAST susceptibility breakpoint. No susceptibility breakpoints have been identified for the other 11 antibiotics by EUCAST, and the MICs of these antibiotics ranged between 0.125 and 4 mg/L.

3.4. Invasion Assays. All clinical isolates of *L. monocytogenes* were tested in invasion assays with HeLa epithelial cells. The actual mean MOI used for cell infection with the clinical isolates was 17:1 (standard error: 0.83). The recovery rates for clinical isolates ranged from 0.09% to 7.26% (median: 1.62, standard error: 0.46). As expected, the recovery rate for

TABLE 2: Antimicrobial susceptibility of 17 *L. monocytogenes* isolates in the E-test.

Antibiotic	Range	MIC (mg/L)		Susceptibility breakpoint (mg/L) ^a	% susceptibility
		50%	90%		
Benzylpenicillin	0.064-1	0.25	0.75	≤1	100
Ampicillin	0.064-1	0.25	0.75	≤1	100
Imipenem	0.125-0.19	0.19	0.19	—	—
Meropenem	0.19-0.75	0.38	0.38	≤0.25	58.8
Erythromycin	0.125-0.38	0.25	0.38	≤1	100
Clindamycin	0.25-8	2	4	—	—
Gentamicin	0.094-1	0.25	0.5	—	—
Vancomycin	0.75-1.5	1.5	1.5	—	—
Daptomycin	0.75-1.5	1	1.5	—	—
Linezolid	1-2	2	2	—	—
Ciprofloxacin	0.5-2	1	1.5	—	—
Moxifloxacin	0.19-0.5	0.38	0.5	—	—
Tetracycline	0.094-1.5	1	1.5	—	—
Tigecycline	0.094-1.5	0.125	0.25	—	—
Rifampin	0.023-0.19	0.094	0.125	—	—
Cotrimoxazole	0.008-0.023	0.012	0.019	≤0.06	100

^aAccording to EUCAST antimicrobial susceptibility breakpoints for *L. monocytogenes*.

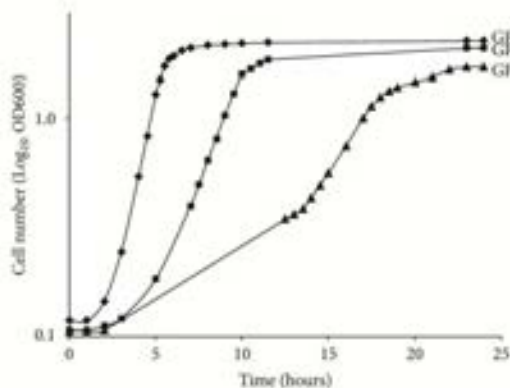


FIGURE 1: Growth patterns of 17 clinical isolates of *Listeria monocytogenes* causing invasive infections at the "Complejo Asistencial Universitario de León" from 2006 to 2014. Two of the isolates had growth patterns different from that of all the other isolates: isolate 6 (GP2) and isolate 7 (GP3), respectively.

the noninvasive $\Delta prfA$ mutant strain was very low (0.13%, standard error: 0.04). Invasiveness was between 0.04 and 3.1 times higher than that of the *L. monocytogenes* serovar 4b clinical control strain (P14) (Figure 2). The isolates clustered into two significantly different groups: those with a high invasion rate similar to that of the wild-type strain P14 (3.36 ± 0.74) (isolates from clinical cases 1, 8, 9, 12, 14, and 15) and isolates with a low invasion rate, similar to that of the isotypic $\Delta prfA$ strain (0.54 ± 0.12) (isolates from clinical cases 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 16, and 17 (Figure 2)).

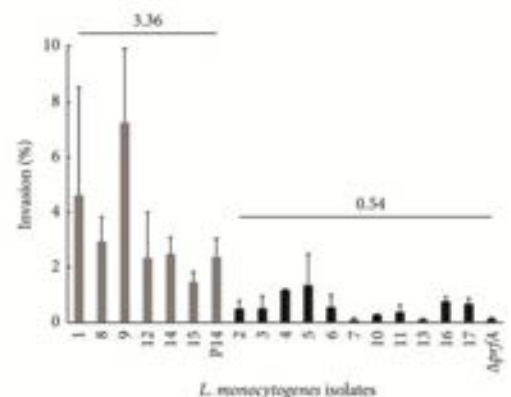


FIGURE 2: Invasion assays for the 17 clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in HeLa epithelial cells. The mean number of internalised bacteria as a percentage of the initial inoculum is shown on the y-axis. The error bars show the standard error of two independent experiments, each performed in duplicate. The wild-type *L. monocytogenes* P14 and noninvasive *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ strains were included, to assess the reproducibility of the experiments.

3.5. Molecular Epidemiological Analysis. Genetic characterisation by PFGE with the restriction enzyme *Apal* revealed 13 different pulsotypes, and characterisation with *AscI* discriminated between 14 genotypes (Simpson's index of diversity values of 0.949 and 0.971, resp.). Fingerprinting revealed the presence of 8–20 DNA fragments between about 40 and 560 kb in size. PFGE analyses combining the results

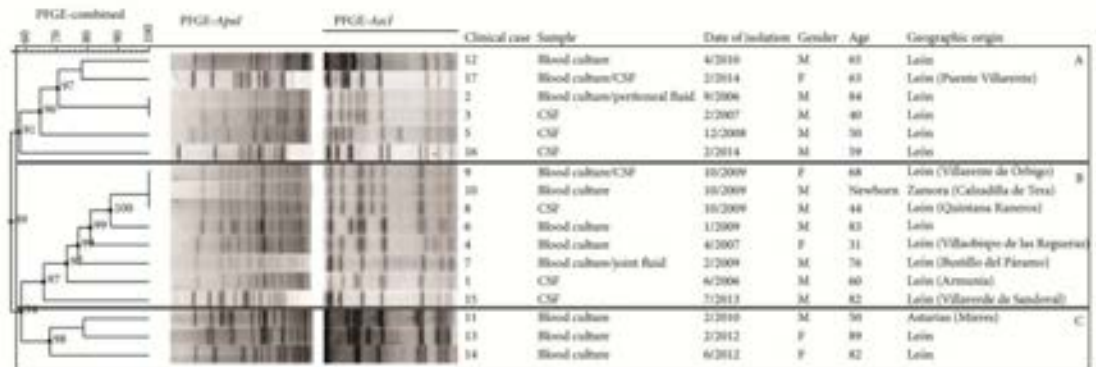


FIGURE 3: Genetic relationships between 17 clinical isolates of *Listeria monocytogenes*, based upon comparison of pulsed-field gel electrophoresis profiles obtained with the restriction enzymes *ApaI* and *AscI*. The dendrogram was produced with a Dice similarity coefficient matrix, using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). Tolerance and optimisation values were set to 1.5%. Clusters are arbitrarily designated A to C. Scale bar indicates similarity values.

obtained with both restriction enzymes identified 14 unique pulsotypes, resulting in a Simpson's index of diversity of 0.971. The clinical isolates displayed 55% similarity and formed three clusters, arbitrarily designated A to C. Cluster A contained six isolates recovered from 2006 to 2014 (58% similarity). Cluster B contained eight isolates recovered from 2006 to 2013 (66% similarity). Cluster C consisted of three isolates (68% similarity) collected from 2010 to 2012. Interestingly, the isolates from clinical cases 8, 9, and 10 on one hand and those from cases 2 and 3 on the other hand had indistinguishable pulsotypes (pulsotypes D and I, resp.). The genetic relationships between *L. monocytogenes* isolates, based on the combined PFGE-genetic profiles obtained with the restriction enzymes *ApaI* and *AscI*, are shown in Figure 3.

MLST analysis of 17 *L. monocytogenes* isolates from clinical cases of listeriosis identified 11 STs (Simpson's index of diversity: 0.926). The oldest and globally most prevalent epidemic clones (ST1, ST2, ST3, ST4, ST7, ST8, and ST9) were represented among the STs of the clinical cases observed in the Spanish regions of León, Asturias, and Zamora in 2006–2014 (Table 1; Figures 4(a) and 4(b)). Ten isolates (58.8%) were assigned to genetic lineage I or III. Four of these isolates were ST1 isolates (3 with PFGE profile D and 1 with PFGE profile H) recovered from human patients from the neighbouring provinces of León and Zamora during 2006 and 2009. ST3 isolates were obtained from two patients from the provinces of León and Asturias in 2009 and 2010, respectively. These cases were not related and the isolates concerned had different PFGE profiles (A and E). Furthermore, ST2, ST4, ST87, and ST389 were sporadically observed, in one isolate each. The *L. monocytogenes* isolates from genetic lineages II ($n = 7$; 41.2%) were more evenly distributed in the MST. The most common allelic profile was ST16 ($n = 3$; 17.6%). ST7, ST8, ST9, and ST399 were observed sporadically, in one isolate each (Table 1).

4. Discussion

Most of the reported cases of listeriosis occur in high-income countries, this infection being largely underreported in developing countries. Hospitalisation records show listeriosis to be the third most costly zoonotic disease in the US [34, 50]. Patients often suffer from comorbid diseases and are immunocompromised, and long-term antibiotic treatment with ampicillin, amoxicillin, and gentamicin may be required. Some *L. monocytogenes* strains can survive treatment with cephalosporin or erythromycin [51]. Livestock and processed foods seem to serve as a source of antibiotic resistance. Some authors have reported increases in the frequency of multidrug-resistant strains (e.g., resistant to amoxicillin-clavulanate and chloramphenicol) [25, 52]. No resistance to benzylpenicillin, ampicillin, erythromycin, or cotrimoxazole was found in our isolates. Remarkably, 10 isolates were classified as resistant to meropenem according to the EUCAST breakpoint for this antibiotic, potentially discouraging its use to treat meningitis. All patients were treated with betalactams (ampicillin or amoxicillin), mostly in combination with gentamicin. Treatment outcome was favourable in 15 patients (88.2%). Mortality is known to be high in patients with invasive listeriosis, severe underlying diseases, meningoencephalitis, and inadequate antimicrobial treatment. The early administration of antibiotics, such as ampicillin or cotrimoxazole, which have rapid bactericidal activity against the pathogen, is essential for cure.

The 17 *L. monocytogenes* clinical isolates included in this study had phenotypic properties consistent with full virulence: β -haemolysis mediated by the product of the listeriolysin gene (*hly*) and lecithinase activity due to the presence of phospholipases (*plcA* and *plcB*). Some differences in growth patterns and invasiveness were observed. Growth pattern (GP) I was observed in all but two of the *L. monocytogenes* isolates (87.5% of all isolates). The *L. monocytogenes*

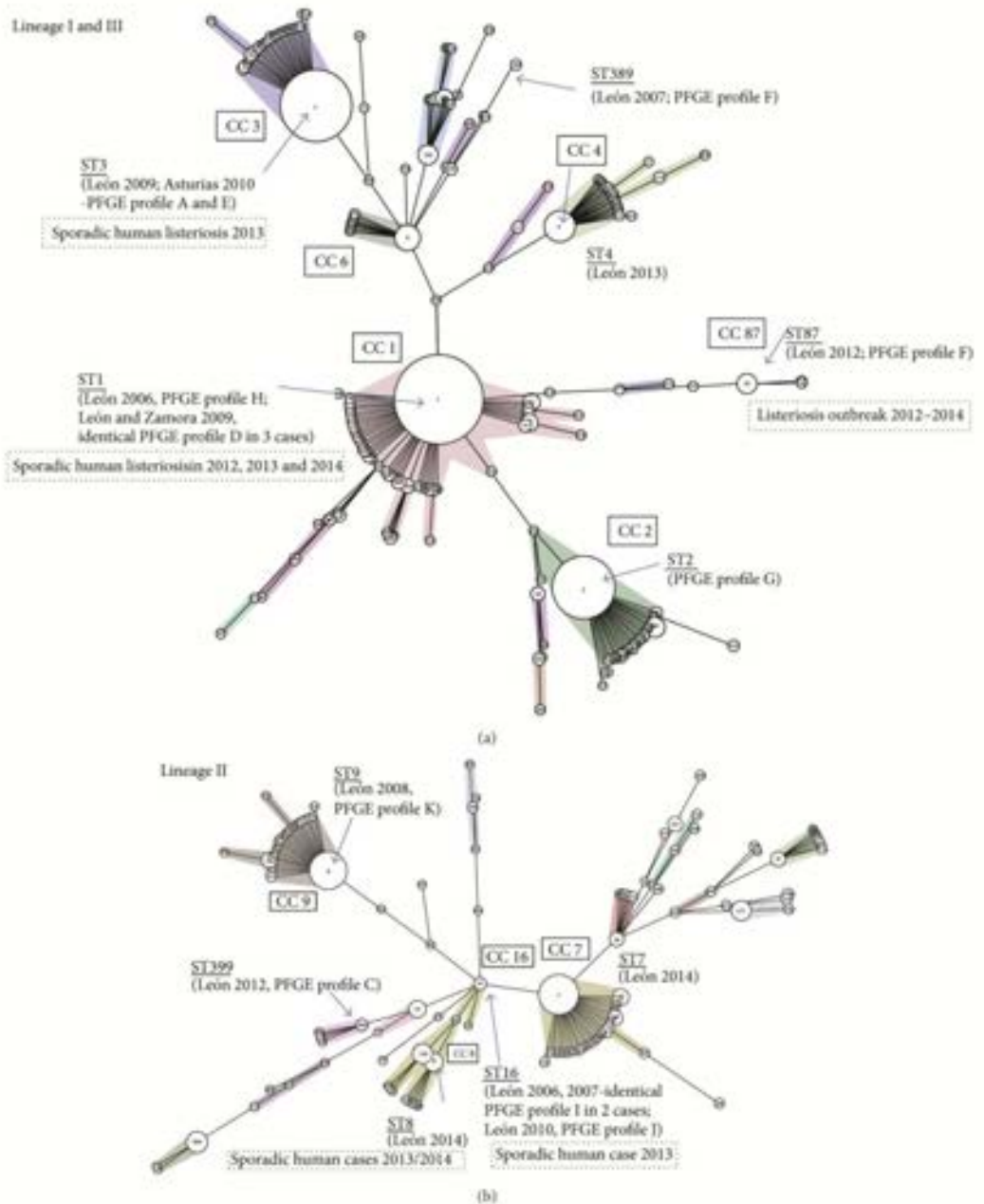


FIGURE 4: Multilocus sequence typing of 17 *Listeria monocytogenes* isolates from sporadic cases of human listeriosis in Spain during the 2006–2014 period. The sequence types were clustered according to the sequence of the *alvC* housekeeping gene, using a minimum spanning tree (MST) tool available from the Pasteur Institute MLST database (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>). The STs from genetic lineages I and III (a) and genetic lineage II (b) found in this study are underlined. Sporadic listeriosis cases and outbreaks in Spain (2012–2014) listed in the Pasteur Institute MLST database are shown in boxes outlined with dotted lines. *L. monocytogenes* sample origins and PFGE profiles are included in each MST. The coloured zones surrounding groups of STs indicate clonal complexes (CC) differing by only one gene from other members of the group.

isolates from cases 6 and 7 (STs 3 and 2) reached the exponential growth phase later than the other isolates (Figure 1). In cell culture assays, invasiveness varied considerably between clinical isolates, with recovery rates ranging from 0.09% to 7.26% (mean 1.62%, standard error 0.46) (Figure 2). The recovery rates for five clinical isolates were reported to range from 4.3% to 30% in a previous study on Vero cells [53]. *L. monocytogenes* isolates 9, 1, and 8 (all ST1) had the highest levels of virulence in cell culture assays *in vitro*, as shown by their invasiveness in HeLa cells (invasiveness up to three times that of the wild-type P14 strain). This finding is consistent with those of most previous studies, reporting that lineage I (4b) strains seem to be more virulent and better able to withstand the adverse conditions present in the stomach of the host [19]. ANOVA revealed the existence of two groups of isolates. Group I consisted of six clinical isolates (35.3%) and the wild-type P14 strain, all with significant levels of invasiveness. By contrast, group II contained 11 isolates (64.7%) with nonsignificant levels of invasiveness, similar to that of the isogenic control strain $\Delta prfA$.

In our study of invasive listeriosis cases, the percentage of lineages I and III isolates of *L. monocytogenes* was similar to that of lineage II isolates (58.8% versus 41.2%, resp.). The isolates responsible for the death of a 68-year-old woman and a foetus were assigned to ST1 and ST389, respectively (lineage I/III, clinical cases 9 and 4). Overall, PFGE identified 14 genotypes and MLST identified 11 genotypes among the 17 *L. monocytogenes* clinical isolates, yielding values of Simpson's index of diversity of 0.971 and 0.926, respectively. This indicates a high level of genomic diversity among the clinical isolates (only 55% similarity on PFGE) despite their recovery at the same hospital, consistent with the findings of previous molecular epidemiology studies.

An analysis of the genomic relationships between isolates unequivocally revealed the occurrence of one previously unreported outbreak of listeriosis in humans. This outbreak occurred in October 2009 and affected three patients living in neighbouring towns (clinical cases 8, 9, and 10: pulsotype D, ST1). Isolate 10 had a significantly lower invasion capacity than isolates 8 and 9 (Figure 2), but this difference may simply reflect the method used, with invasion capacity being evaluated *in vitro*. *L. monocytogenes* ST1 isolates from Spanish patients are also present in the Pasteur Institute MLST database (2012–2014; Figure 4(a)). Moreover, an epidemiological connection was identified between two isolates from 2006 and 2007, both of which belonged to ST16 and had a PFGE profile I. Data for *L. monocytogenes* ST16 and ST8 isolates from sporadic clinical cases of human listeriosis are also available from the MLST database (Figure 4(b)). Many previous molecular epidemiology studies have detected otherwise unreported outbreaks of listeriosis. In a recent Spanish study, a large proportion of the clinical isolates had indistinguishable pulsotypes, suggesting the possible occurrence of listeriosis outbreaks related to international foodborne outbreaks. Most of these isolates were assigned to ECI (4b; CCI; 46.2%) and ECIII (1/2a; CCI; 33.3%) [54]. Thus, molecular epidemiology studies of *L. monocytogenes* can help to identify and trace the sources of outbreaks that would otherwise pass unnoticed.

Interestingly, this is the second time that ST87 has been linked to human disease (it was isolated in León in February 2012). Pérez-Trallero et al. [55] recently reported the occurrence of two outbreaks affecting 15 people and caused by ST87 strains in Guipúzcoa (northern Spain) in 2013 and 2014. Our study demonstrates that ST87 was already circulating in the Spanish clinical environment before the outbreak in Northern Spain. It would be interesting to follow the dissemination of this clone to assess its potential emergence.

In conclusion, this retrospective study focused on invasive *L. monocytogenes* infections in a Spanish healthcare institution over a nine-year study period. Molecular epidemiology studies clearly revealed the occurrence of a previously unreported outbreak of listeriosis in Northwest Spain. Our findings, along with those of previous studies [54–57], indicate that molecular epidemiology studies can help to identify and trace the source of the outbreaks that might otherwise pass unnoticed. Better centralised collection and subtyping of clinical isolates of *L. monocytogenes* would improve listeriosis monitoring, making it possible to trace the sources of Spanish outbreaks and to prevent cross-border outbreaks.

Abbreviations

CAULE:	Complejo Asistencial Universitario de León
BHI:	Brain heart infusion
MOI:	Multiplicity of infection
MLST:	Multilocus sequence typing
ST:	Sequence type
MST:	Minimum spanning tree
CC:	Clonal complex
PFGE:	Pulsed-field gel electrophoresis
GP:	Growth pattern.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study received support from the *Gerencia Regional de Salud, Junta de Castilla y León*, Spain, research project GRS 698/A/2011 and the EU 7th Framework Programme through the PROMISE project (Project no. 265877). The authors would like to thank the Pasteur Institute for providing access to the MLST database for *L. monocytogenes* via the Genotyping of Pathogens and Public Health Platform.

References

- [1] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). "Scientific opinion on a review on the European Union Summary reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009 and 2010—specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks," *EFSA Journal*, vol. 10, no. 6, article 2726, 2012.

- [2] F. Allerberger and M. Wagner, "Listeriosis: a resurgent food-borne infection," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 16, no. 1, pp. 16–23, 2010.
- [3] E. Arslan, E. Meynet, M. Sanbul et al., "The clinical features, diagnosis, treatment, and prognosis of neuroinvasive listeriosis: a multinational study," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2015.
- [4] R. Pouillot, K. Hoelzer, K. A. Jackson, O. L. Henan, and B. J. Silk, "Relative risk of listeriosis in foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 5, pp. S405–S410, 2012.
- [5] B. J. Silk, K. A. Date, K. A. Jackson et al., "Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004–2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 5, pp. S396–S404, 2012.
- [6] European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012," *EFSA Journal*, vol. 12, no. 2, article 3547, 312 pages, 2014.
- [7] B. Swaminathan and P. Gerner-Smidt, "The epidemiology of human listeriosis," *Microbes and Infection*, vol. 9, no. 10, pp. 1236–1243, 2007.
- [8] S. T. Ooi and B. Lorber, "Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, no. 9, pp. 1327–1332, 2005.
- [9] K. Zelenik, J. Avbersek, M. Pate et al., "Cutaneous listeriosis in a veterinarian with the evidence of zoonotic transmission—a case report," *Zoonoses and Public Health*, vol. 61, no. 4, pp. 238–241, 2014.
- [10] E. J. Cartwright, K. A. Jackson, S. D. Johnson, L. M. Graves, B. J. Silk, and B. E. Mahon, "Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [11] R. E. Lamont, J. Sobel, S. Mazaki-Tovi et al., "Listeriosis in human pregnancy: a systematic review," *Journal of Perinatal Medicine*, vol. 39, no. 3, pp. 227–236, 2011.
- [12] J. A. Painter, R. M. Hoekstra, T. Ayers et al., "Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, article 407, 2013.
- [13] D. Liu, "Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 55, no. 6, pp. 645–659, 2006.
- [14] R. H. Orsi, H. C. den Bakker, and M. Wiedmann, "*Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 301, no. 2, pp. 79–96, 2011.
- [15] S. Kathariou, "*Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective," *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 11, pp. 1811–1829, 2002.
- [16] T. Cantinelli, V. Chenal-Francoise, I. Diancourt et al., "Epidemic clones of *Listeria monocytogenes* are widespread and ancient clonal groups," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 11, pp. 3770–3779, 2013.
- [17] M. Ragon, T. Wirth, F. Hollndt et al., "A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution," *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 9, Article ID e1000146, 2008.
- [18] V. Chenal-Francoise, J. Lopez, T. Cantinelli et al., "World wide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 6, pp. 1110–1112, 2011.
- [19] J. Chen, X. Luo, L. Jiang et al., "Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems," *Food Microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 103–111, 2009.
- [20] S. Lomonaco, B. Verghese, P. Gerner-Smidt et al., "Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 1, pp. 147–150, 2013.
- [21] M. M. Koopmans, M. C. Brouwer, M. W. Bijlsma et al., "*Listeria monocytogenes* sequence type 6 and increased rate of unfavorable outcome in meningitis: epidemiologic cohort study," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 57, no. 2, pp. 247–253, 2013.
- [22] D. Althaus, A. Lehner, S. Brisse, M. Maury, T. Tasara, and R. Stephan, "Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2013 from human infections in Switzerland," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 11, no. 10, pp. 753–758, 2014.
- [23] M. A. De Francesco, S. Corbellini, G. Piccinelli et al., "A cluster of invasive listeriosis in Brescia, Italy," *Infection*, vol. 43, no. 3, pp. 379–382, 2015.
- [24] C. Mammìna, A. Parisi, A. Guaita et al., "Enhanced surveillance of invasive listeriosis in the Lombardy region, Italy, in the years 2006–2010 reveals major clones and an increase in serotype 1/2a," *BMC Infectious Diseases*, vol. 13, no. 1, article 152, 2013.
- [25] E. Domènech, A. Jimenez-Belenguier, J. A. Amorós, M. A. Ferrus, and I. Escriche, "Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain," *Food Control*, vol. 47, pp. 120–125, 2015.
- [26] S. T. Lambert, S. Ivarsson, G. Lopez-Valladares, M. Sjöstedt, and R. Lindqvist, "Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden 2010," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 166, no. 1, pp. 186–192, 2013.
- [27] G. Lopez-Valladares, W. Tham, V. S. Parihar et al., "Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958–2010)," *Epidemiology & Infection*, vol. 142, no. 11, pp. 2251–2260, 2014.
- [28] B. T. Lunestad, T. T. T. Truong, and B.-A. Lindstedt, "A multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Listeria monocytogenes* isolated from Norwegian salmon-processing factories and from listeriosis patients," *Epidemiology and Infection*, vol. 141, no. 10, pp. 2101–2110, 2013.
- [29] U. M. Nakari, L. Rantala, A. Pihlajasaari et al., "Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010," *Epidemiology & Infection*, vol. 142, no. 11, pp. 2261–2269, 2014.
- [30] V. De Castro, I. Escudero, J. Rodriguez et al., "Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Birkaba, Spain, August 2012," *Euro Surveillance*, vol. 17, no. 42, p. 20298, 2012.
- [31] S. J. Knabel, A. Reimer, B. Verghese et al., "Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, no. 5, pp. 1748–1751, 2012.
- [32] D. Schoder, B. Stessl, K. Szakmary-Brändle, P. Rossmannith, and M. Wagner, "Population diversity of *Listeria monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational

- listeriosis outbreak 2009/2010," *Food Microbiology*, vol. 39, pp. 68-73, 2014.
- [33] B. Stessl, M. Fricker, E. Fox et al., "Collaborative survey on the colonization of different types of cheese-processing facilities with *Listeria monocytogenes*," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 11, no. 1, pp. 8-14, 2014.
- [34] F. P. Valero and J. V. Rafart, "Incidence study of listeriosis in Spain," *Gaceta Sanitaria*, vol. 28, no. 1, pp. 74-76, 2014.
- [35] M. O. Martínez, R. J. Colomina, M. M. Domínguez, E. A. Guerrero, and A. A. de la Encarnación, "Invasive listeriosis in Valencian community, Spain, during the period 2008-2010," *Revista Española de Salud Pública*, vol. 86, pp. 645-651, 2012.
- [36] D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, and M. Pla, "Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 233, no. 2, pp. 257-267, 2004.
- [37] D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, M. Scortti, T. Esteve, J. A. Vázquez-Boland, and M. Pla, "Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *listO2483* targets and AmpliFluor technology," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 3, pp. 1366-1377, 2004.
- [38] D. Rodríguez-Lázaro, L. López-Enríquez, and M. Hernández, "SmcI as a novel diagnostic marker for quantitative detection of *Listeria ivanovii* in biological samples," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 109, no. 3, pp. 863-872, 2010.
- [39] D. Rodríguez-Lázaro, M. Pla, M. Scortti, H. J. Monzó, and J. A. Vázquez-Boland, "A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 12, pp. 9008-9012, 2005.
- [40] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 5.0*, 2015.
- [41] M. Suárez, B. González-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, and J. A. Vázquez-Boland, "A role for *ActA* in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*," *Cellular Microbiology*, vol. 3, no. 12, pp. 853-864, 2001.
- [42] M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, and P. Martin, "Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 8, pp. 3819-3822, 2004.
- [43] A. Leclercq, V. Chenal-Francoise, H. Dieye et al., "Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-vI," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 147, no. 1, pp. 74-77, 2011.
- [44] L. M. Graves and B. Swaminathan, "PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-62, 2001.
- [45] P. Martin, C. Jacquet, V. Goulet, V. Vaillant, and H. De Valk, "Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 3, no. 3, pp. 303-308, 2006.
- [46] P. R. Hunter and M. A. Gaston, "Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 26, no. 11, pp. 2465-2466, 1988.
- [47] Comparing partitions online tool, 2013, <http://darwin.phyloz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home>.
- [48] T. J. Barrett, P. Gerner-Smidt, and B. Swaminathan, "Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 3, no. 1, pp. 20-31, 2006.
- [49] Institut Pasteur, "*Listeria monocytogenes* MLST database," 2015, <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>.
- [50] C. M. De Noordhout, B. Devleeschauwer, F. J. Angulo et al., "The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 14, no. 11, pp. 1073-1082, 2014.
- [51] F. Marco, "In vitro activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains isolated in Barcelona, Spain," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 38, no. 4, pp. 259-261, 2000.
- [52] A. Alonso-Hernando, M. Prieto, C. García-Fernández, C. Alonso-Calleja, and R. Capita, "Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain," *Food Control*, vol. 23, no. 1, pp. 37-41, 2012.
- [53] F. Yamada, F. Ueda, Y. Ochiai et al., "Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 66, no. 1, pp. 96-103, 2006.
- [54] J. A. Lepe, M. J. Torres, J. Liró, R. Luque, and J. Aznar, "Microbiological characterisation of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in Andalusia," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 30, no. 10, pp. 602-607, 2012.
- [55] E. Pérez-Trallero, C. Zigorraga, J. Artieda, M. Alkoeta, and J. M. Marimón, "Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 20, no. 12, pp. 2155-2157, 2014.
- [56] R. Magalhães, G. Almeida, V. Ferreira et al., "Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012," *Eurosurveillance*, vol. 20, no. 17, p. 21104, 2015, no.
- [57] D. Montero, M. Bódero, G. Riveros et al., "Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile," *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, article 384, 2015.

Sección 3.3.2

Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish Airport

David Rodríguez-Lázaro^{1,2}, Jaime Ariza-Miguel¹, Marta Diez Valcarce³, Beatrix Stessl⁴, Janine Beutlich⁵, Isabel Fernández-Natal^{6,7}, Marta Hernández¹, Martin Wagner^{4,5}, Jordi Rovira²

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain; ²Microbiology Unit, University of Burgos, Burgos, Spain; ³Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Sciences, University of Burgos; ⁴Institute of Milk Hygiene, Milk Technology and Food Science, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria; ⁵Christian Doppler Laboratory for Molecular Food Analytics, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria; ⁶Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain; ⁷Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, Leon, Spain

Publicado en *International Journal of Food Microbiology*. 2014. pii: S0168-1605(14)005



Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport

David Rodríguez-Lázaro^{a,b,*}, Jaime Ariza-Miguel^a, Marta Díez-Valcarce^c, Beatrix Stessi^d, Janine Beutlich^e, Isabel Fernández-Natal^{a,b,h}, Marta Hernández^a, Martin Wagner^{d,e}, Jordi Rovira^c

^a Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid, Spain

^b Microbiology Section, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

^c Department of Biotechnology and Food Science, Faculty of Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

^d Institute of Milk Hygiene, Milk Technology and Food Science, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

^e Christian Doppler Laboratory for Molecular Food Analysis, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

^f Department of Biological Safety, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

^g Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain

^h Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, León, Spain

ARTICLE INFO

Available online 23 October 2014

Keywords:

Listeria monocytogenes
Salmonella spp.
Campylobacter
Escherichia coli O157:H7
Neglected route of transmission
International flights

ABSTRACT

Two hundred food samples of animal origin confiscated from passengers arriving on flights from non-European countries at the International Airport of Bilbao (Spain) were tested for the presence of four main bacterial foodborne pathogens (*Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.) during 2012 and 2013. Overall, 20 samples were positive for *L. monocytogenes* (10%) and 11 for *Salmonella* spp. (5.5%), whereas *Campylobacter* spp. and *E. coli* O157:H7 were not detected in any sample. The positive isolates were widely clustered: 14 and 7 different pulsotypes for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. isolates, respectively. Nine sequence types (ST) were detected for *L. monocytogenes*: ST2 (45%), ST9 (15% isolates), ST8 and ST87 (10%), and ST308, ST37, ST155 and ST378 (5%). The *Salmonella* spp. isolates belonged to seven serovars; monophasic serovar 4,12:d:– (3; 27.3%), Rautiform (2; 18.2%), Anatum (2; 18.2%), Oranienburg, Enteritidis, Newport and Typhimurium (1; 9.1% each). Antibiotic resistance among *L. monocytogenes* isolates was high, especially for clindamycin and daptomycin (more than 95% of the isolates). These results indicate that food samples imported by travelers in their personal luggage may harbor the most prevalent *L. monocytogenes* genotypes and *Salmonella* spp. serovars responsible for foodborne outbreaks worldwide. Consequently, international travel can play an important role in the prevalence and dissemination of successful clones of foodborne pathogenic bacteria, and continuous monitoring of international movements is of importance to better understand clonal evolution and emergence and dissemination of successful lineages.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Foodborne diseases are a global public health threat due to their high prevalence and the associated costs of treatment: up to 30% of the population living in industrialized countries suffer from foodborne diseases every year (Vichasamy et al., 2010), and the cost associated is estimated to be 77,700 M\$ annually in the USA (Scharif, 2012). The European Food

Safety Authority (EFSA) has estimated that over 320,000 human cases are reported each year in the EU, though the real number is likely to be much higher since mild infections are infrequently reported (EFSA, European Food Safety Authority and ECDC, European Centre for Disease Prevention, Control, 2014). Among bacterial foodborne pathogens *Campylobacter*, *Salmonella* spp., verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *Listeria monocytogenes* are the most frequently reported in the EU, with notification rates per 100,000 population of 214.27, 91.03, 5.67 and 1.64, respectively (EFSA, European Food Safety Authority and ECDC, European Centre for Disease Prevention, Control, 2014).

The potential source of foodborne pathogenic agents is widening, as neglected routes of transmission exist (e.g. cross-border routes). Microbial threats are sent by post or carried in the baggage of travelers arriving from countries outside the EU in the form of personal consignments containing meat, milk or products thereof (Mangili and Gendreau, 2005). As a result, marketing of unauthorized food which has not passed

Abbreviations: CC, clonal complex; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; MLST, multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; RP, resistance profiles; SID, Simpson's Index of Diversity; ST, sequence type; VTEC *Escherichia coli*, verotoxin-producing *Escherichia coli*.

* Corresponding author at: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería, Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, Valladolid, Spain. Tel.: +34 983 415233; fax: +34 983 410462.

E-mail address: mclazaro@gmail.com (D. Rodríguez-Lázaro).

the appropriate controls constitutes a neglected route of foodborne pathogen transmission. In this study, we have evaluated for the first time the presence of the main bacterial foodborne pathogens (i.e. *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*) in food confiscated from non-EU flight passengers from April 2012 to June 2013 at an international airport (Bilbao, Spain); the work was done within the framework of the European research project PROMISE (www.promise-net.eu). This information can provide an overview on the prevalence and the potential risk of foodborne pathogens in illegally imported food. Furthermore this study aims to analyze the routes of pathogenic genotypes being disseminated via international passenger transport.

2. Material and methods

2.1. Food samples

During April 2012 to June 2013, 200 food samples confiscated by the border authorities at the International Bilbao Airport, Spain (www.aeropuertodebilbao.net) from passengers' luggage arriving from 22 non-EU countries were tested. In total, 122 meat samples of diverse animal origin (mainly dried or frozen raw meat samples including antelope, beef, chicken, duck, guinea pig, pork, rodents, and turkey), 75 dairy products (74 cheeses and one butter) and three eggs were included in the confiscated material. The samples were from five continents: Africa [Equatorial Guinea (7) and Morocco (2)], Central and South America [Argentina (9), Bolivia (36), Brazil (13), Colombia (4), Dominican Republic (6), Ecuador (20), Paraguay (6), Peru (29), Puerto Rico (2), and Venezuela (2)], Asia [People's Republic of China (33), Nepal (1), and Turkey (5)], Eastern Europe [Bosnia and Herzegovina (3), Georgia (4), Moldavia (10), Serbia (3), and Ukraine (3)], Oceania-Australia (1), and one sample from an unknown origin (flight came from Paris, France).

2.2. Detection of the foodborne pathogens

The detection of thermotolerant *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. was performed according to the following international reference methods: ISO 10272-1 (ISO, 2006), ISO 11290-1 (ISO, 1996, 2004), ISO 16654 (ISO, 2001), and ISO 6579 (ISO, 2002). Further confirmation of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. isolates was performed by specific qPCRs (Rodríguez-Lázaro et al., 2003; Rodríguez-Lázaro et al., 2004; Rodríguez-Lázaro et al., 2005).

2.3. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility of the *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. isolates was tested by the microdilution method following the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Breakpoints were adapted from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines. Antimicrobial susceptibilities of *L. monocytogenes* isolates were tested with 10 antimicrobials: ciprofloxacin, clindamycin, daptomycin, gentamicin, linezolid, penicillin, rifampicin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, and vancomycin. For *Salmonella* spp. isolates, the antimicrobial susceptibility was tested for the following 29 agents: amikacin, ampicillin, amoxicillin/clavulanate, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, cefuroxime, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, eretapenem, florfenicol, gentamicin, imipenem, kanamycin, nalidixic acid, piperacillin/tazobactam, streptomycin, sulfamethoxazole, sulfamethoxazole/trimethoprim, tazobactam, tetracycline, tigecycline, tobramycin, and trimethoprim. Isolates were clustered into resistance profiles (RP) according to their susceptibility to the antimicrobials. Isolates exhibiting resistance to three or more antibiotics were considered multiresistant.

2.4. Serotyping of bacterial isolates

Salmonella spp. serotyping was done following the White-Kauffmann-LeMinor scheme (Grimont and Weill, 2007). *L. monocytogenes* serogroups were defined using a multiplex PCR targeting the specific target genes *lmoD737*, *lmo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* and *Listeria* spp. specific *prx* published by Doumith et al. (2004) and amended by Leclercq et al. (2011) for PCR IVb-VI.

2.5. Genotyping of positive isolates

All isolates were genomically characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) following the standardized protocols from PulseNet (Graves and Swaminathan, 2001; Ribot et al., 2006). PFGE patterns were analyzed with BioNumerics v.6.6 (Applied-Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) to describe genetic relationships among isolates. Dendograms were constructed using the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group mathematical average (UPGMA) clustering algorithm with 1.5% in the tolerance and optimization values. The Simpson's index of diversity was calculated to assess the discriminative power of PFGE by using the Comparing Partitions website hosted at <http://darwin.phylotz.net/ComparingPartitions/>.

L. monocytogenes isolates were further characterized by multilocus sequence typing (MLST) as previously described (Ragon et al., 2008). Allelic profiles obtained by MLST were assigned by comparing the consensus sequences with the information already published in the Institute Pasteur *L. monocytogenes* MLST database (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/Pf8/mlst/Lmono.html> accessed: 24.04.2014). To define the relationships among strains at the microevolutionary level, an allelic profile-based comparison applying a minimum spanning tree (MST) was performed applying the Institute Pasteur online tool. Clonal complexes (CC) were defined as groups of STs differing by only one housekeeping gene from another member of the group (Ragon et al., 2008). The adjusted Wallace coefficient for quantification of the agreement between PFGE typing and MLST was calculated on the Comparing Partitions website.

3. Results

3.1. Presence of foodborne pathogens in the tested food samples

Twenty samples were positive for *L. monocytogenes* (10%, 20/200), including five from cheese, thirteen from meat, and two from poultry samples. Eleven samples were positive for *Salmonella* spp., including five cheese, four meat samples and two poultry samples. Only one sample (a cheese from Bolivia) was co-contaminated by both pathogens. However, *Campylobacter* spp. and *E. coli* O157:H7 were not detected in any sample. Eleven *L. monocytogenes* isolates (55%) were related to genetic lineage I (PCR-serogroup 4b, 4d, 4e; 1/2b, 3b), and nine to genetic lineage II (PCR-serogroup 1/2a, 3a; 1/2c, 3c). *Salmonella* spp. isolates belonged to seven serovars: monophasic serovar 4,12:d:– (27.3%), Rauform (18.2%), Anatum (18.2%), Oranienburg, Enteritidis, Newport and Typhimurium (9.1% each).

3.2. Antimicrobial susceptibility

All *L. monocytogenes* isolates showed antimicrobial resistance to at least one antibiotic and were assigned to four RP (Table 1); all isolates were resistant to clindamycin, 19 to daptomycin (95%), two to tetracycline (10%) and one to ciprofloxacin (5%). Three RPs were detected for the 11 *Salmonella* spp. isolates (Table 1): 3 isolates were resistant to ciprofloxacin (27.3%), and 1 isolate to aztreonam, nalidixic acid and colistin (9.1% each).

Table 1*Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* detected in food samples confiscated from international flight passengers from eleven non-EU countries, 2012–2013.

Isolate code	Species	Source	Lineage	PCR serotype/serovar	Country of origin	Isolation date	ST (CC)	Antimicrobial resistance ^c
6	<i>L. monocytogenes</i>	Cheese	I	4b, 4d, 4e	Ecuador	19/05/2012	2 (2)	DAP, CLIN
32	<i>L. monocytogenes</i>	Pork meat	I	4b, 4d, 4e	Ukraine	14/05/2012	2 (2)	CLIN
41	<i>L. monocytogenes</i>	Pork meat	I	4b, 4d, 4e	Argentina	10/05/2012	2 (2)	DAP, CLIN
44	<i>L. monocytogenes</i>	Cheese	I	4b, 4d, 4e	Georgia	03/08/2012	2 ^a (2)	DAP, CLIN
47	<i>L. monocytogenes</i>	Beef meat	I	4b, 4d, 4e	Ecuador	11/09/2012	2 (2)	DAP, CLIN
49	<i>L. monocytogenes</i>	Beef meat	I	4b, 4d, 4e	Ecuador	11/09/2012	2 (2)	DAP, CLIN
57	<i>L. monocytogenes</i>	Cheese	I	4b, 4d, 4e	Ecuador	15/05/2012	2 (2)	DAP, CLIN
86	<i>L. monocytogenes</i>	Cheese	I	4b, 4d, 4e	Peru	30/05/2012	2 (2)	DAP, CLIN
153	<i>L. monocytogenes</i>	Beef meat	I	1/2b, 3b	Colombia	07/04/2013	87 (87)	DAP, CLIN
177	<i>L. monocytogenes</i>	Meat	I	1/2b, 3b	Venezuela	05/04/2013	87 (87)	DAP, CLIN
189	<i>L. monocytogenes</i>	Meat	I	1/2b, 3b	Nepal	09/03/2013	308 (5 ^b)	DAP, CLIN
33	<i>L. monocytogenes</i>	Pork meat	II	1/2a, 3a	Ukraine	14/05/2012	37 (5 ^b)	DAP, CLIN
63	<i>L. monocytogenes</i>	Meat	II	1/2a, 3a	China	02/09/2012	8 (8)	DAP, CLIN
65	<i>L. monocytogenes</i>	Meat	II	1/2a, 3a	China	02/09/2012	8 (8)	DAP, CLIN
131	<i>L. monocytogenes</i>	Turkey	II	1/2a, 3a	Brazil	13/01/2013	155 (155)	DAP, CLIN
115	<i>L. monocytogenes</i>	Meat	II	1/2c, 3c	Turkey	12/02/2013	9 (9)	DAP, CLIN
137	<i>L. monocytogenes</i>	Cheese	II	1/2c, 3c	Bolivia	16/02/2013	9 (9)	DAP, CLIN
112	<i>L. monocytogenes</i>	Duck meat	II	1/2c, 3c	China	20/02/2013	9 (9)	DAP, CLIN
210	<i>L. monocytogenes</i>	Meat	II	1/2a, 3a	Colombia	16/05/2013	378 (5b)	DAP, CLIN, TET, CP
214	<i>L. monocytogenes</i>	Poultry	II	1/2a, 3a	Morocco	19/05/2013	199 ^a	DAP, CLIN, TET
45	<i>S. enterica</i>	Cheese	Rauslern	Rauslern	Georgia	03/08/2012		None
52	<i>S. enterica</i>	Cheese	4,12:d:--	4,12:d:--	Bolivia	01/08/2012		CP, NAL
72	<i>S. enterica</i>	Cheese	Rauslern	Rauslern	Moldova	30/08/2012		None
85	<i>S. enterica</i>	Meat	4,12:d:--	4,12:d:--	Peru	30/05/2012		CP
90	<i>S. enterica</i>	Cheese	4,12:d:--	4,12:d:--	Peru	30/05/2012		CP
96	<i>S. enterica</i>	Poultry	Enteritidis	Enteritidis	Eq. Guinea	24/08/2012		COL
97	<i>S. enterica</i>	Poultry	Dranienburg	Dranienburg	Eq. Guinea	24/08/2012		None
132	<i>S. enterica</i>	Meat	Anatum	Anatum	Bolivia	16/02/2013		None
133	<i>S. enterica</i>	Meat	Typhimurium	Typhimurium	Bolivia	16/02/2013		None
134	<i>S. enterica</i>	Meat	Anatum	Anatum	Bolivia	16/02/2013		None
137	<i>S. enterica</i>	Cheese	Newport	Newport	Bolivia	16/02/2013		None

ST, sequence type; CC, clonal complex.

^a Nearest ST.^b S. singletons.^c DAP, daptomycin; CLIN, clindamycin; TET, tetracycline; CP, ciprofloxacin; NAL, nalidixic acid; COL, colistin.

3.3. Genomic characterization

PFGE typing of *L. monocytogenes* with the restriction enzyme *ApaI* provided 14 genotypes, resulting in a Simpson's Index of Diversity

(SID) of 0.94 (CI 95%, 0.86–1). PFGE with the secondary restriction enzyme *AscI* did not provide further discrimination and therefore was not included in the analysis (10 genotypes; SID of 0.83, CI 95%, 0.69–0.97). As expected, a good correlation between the clusters and

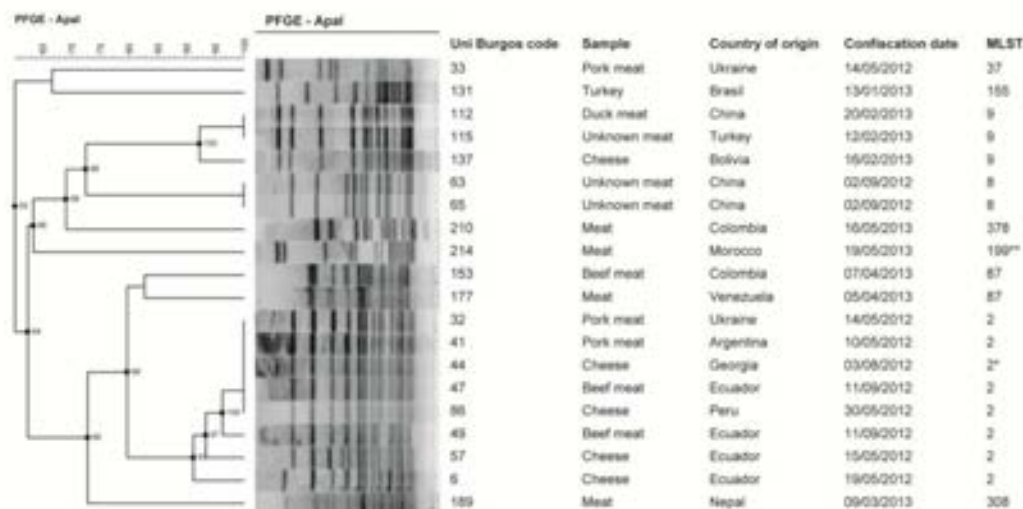


Fig. 1. Genetic relationships among 20 *Listeria monocytogenes* isolates based upon comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles obtained with the restriction enzyme *ApaI*. The dendrogram was produced by using a Dice similarity coefficient matrix with unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The scale bar indicates similarity values. CP, ciprofloxacin; CLIN, clindamycin; DAP, daptomycin; TET, tetracycline.

the lineages were detected. Most of the isolates obtained in food samples from the same passenger exhibited the same or closely related genotypes, with the exception of isolates from the passenger 2, which belonged to lineages I, III and II and clustered in different groups. We did not find clear relationships among the genotype and the country of origin or the sample type. Interestingly, all three isolates from China belonged to lineage II and clustered in the same group (Fig. 1).

A further characterization by MLST revealed nine sequence types (ST), resulting in a SID of 0.86 (CI 95%, 0.75–0.98). Eleven *L. monocytogenes* isolates (55%) were assigned to genetic lineages I and III. The majority corresponded to *L. monocytogenes* ST2 ($n = 8$; 40%) overrepresented among cheese and meat isolates from South America (Argentina, Ecuador, Peru), Georgia and Ukraine. Two *L. monocytogenes* isolated from confiscated Venezuelan and Colombian meat samples were confirmed as ST87. Generally, the *L. monocytogenes* genetic lineages II isolates ($n = 9$; 45%) were more heterogeneously distributed in the MST. The most common allelic profiles were ST8 and ST9 ($n = 5$; 25%), thereof were three *L. monocytogenes* isolated from Chinese meat samples. *L. monocytogenes* genetic lineage II isolates were present in meat and cheese samples imported by travelers from four continents [South America (ST9, ST155 and ST378), Asia (ST8 and ST9), Africa (ST199) and Europe (ST37)] (Fig. 2).

Genomic characterization of *Salmonella* spp. isolates by XbaI-PFGE provided a fingerprint pattern consisting on 11–16 DNA fragments of 12–1150 kbp, approximately. Overall, 7 pulsotypes were detected resulting in a SID of 0.909 (CI 95%, 0.822–0.996). The genotypes showed 36.7% similarity. Isolates belonging to the same serovar showed indistinguishable fingerprint patterns regardless of the geographical origin of the passenger or the sample type from which they were recovered (Fig. 3).

4. Discussion

The opportunity of frequent international travel across borders in a globalized world may increase the potential spread of zoonotic agents by passengers (Díaz, 2011). Nowadays, the affordability of air travel and mobility of people has allowed that around 2 billion people travel

in commercial flights every year (Mangili and Gendreau, 2005). Illegally transported foods are sometimes also sold without the appropriate official food controls, and as a result they can constitute a neglected route of transmission of foodborne pathogens. Border controls (at airports, border checkpoints, etc.) act as “gates” into the EU and these controls seem to be ineffective barriers at preventing import of food, which poses a risk of pathogen entrance. Consequently, a globalized society requires continuous monitoring of foodborne pathogens to understand the trends in their prevalence as well as which clones are involved in foodborne outbreaks.

In this study we have evaluated, for the first time, the presence of bacterial foodborne pathogens in food confiscated from luggage of non-EU flights passengers (from 22 different countries) at the International Bilbao airport (Bilbao, Spain). A moderately high percentage of samples was positive for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. (10% and 5.5% respectively). However, *Campylobacter* and *E. coli* O157:H7 were not detected in any sample. According to the EFSA report on trends and sources of zoonoses in 2012, the *L. monocytogenes* prevalence was very low at the retail level, with the highest rates in RTE fishery and meat products (0.5% and 0.4%) (EFSA, European Food Safety Authority and ECDC, European Centre for Disease Prevention, Control, 2014). Interestingly, the *L. monocytogenes* prevalence among confiscated food samples was higher: 6.8%, 12.9% and 9.5% in cheese, meat and poultry products, respectively. The presence of *L. monocytogenes* genetic lineage I and II among food strains has been discussed. Several studies have reported that lineage II isolates are frequently isolated from food and food-related environments, although other studies have detected a higher proportion of lineage I isolates (Orsi et al., 2011). In the current study similar percentages of *L. monocytogenes* lineages I and II isolates (55% and 45%) were detected (Table 1).

When comparing *L. monocytogenes* ST isolated from confiscated food based on the country of origin to the MLST database of Institute Pasteur, it was noted that the majority of STs were isolated during the last decades of the previous century. Haase et al. (2014) compared a large *L. monocytogenes* strain set by MLST typing and underlined the wide distribution of certain STs and clonal complexes (CC) through different decades and origins which disappeared and re-emerged again.

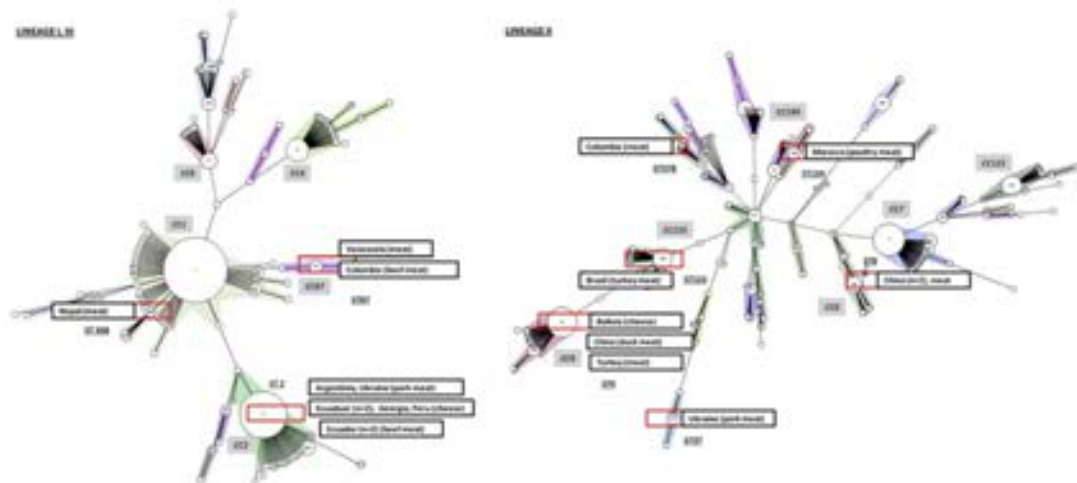


Fig. 2. Multi-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes* isolated from confiscated food samples at the Airport of Bilbao (Spain). The sequence types (ST) were clustered according to the abcB base-coding gene using a minimum spanning tree (MST) tool available from the Institute Pasteur MLST Database. Red surrounded numbers denote the corresponding ST. *L. monocytogenes* strains were grouped into clonal complexes (CC; marked in gray). Clonal complexes are colored with a random color, defined as groups of profiles differing by no more than one gene from at least one other profile of the group. *Stains with no CC designation correspond to genotypes that are not closely related to any other genotype (singletons). The country origin and source of current *L. monocytogenes* isolates are included in each MST.



Fig. 3. Genetic relationships among 11 *Salmonella* spp. isolates based upon comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles obtained with the restriction enzyme *Xba*I. The dendrogram was produced by using a Dice similarity coefficient matrix with unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The scale bar indicates similarity values, CP, ciprofloxacin; COL, colistin; NAL, nalidixic acid.

L. monocytogenes ST2, followed by ST87, stable genotypes over-time, were the most prevalent ST isolated from confiscated South American, Ukraine and Georgian food samples. Besides, ST2 was most often detected in confiscated cheese samples. More recently, Chenal-Francoise et al. (2011) described the worldwide distribution of major *L. monocytogenes* clones and also detected a high prevalence of the same STs among their food isolates from Central and South America. According to the MLST database of Institute Pasteur an outbreak caused by ST87 was registered during 2013 and 2014 in Spain. Wang et al. (2012) reported that ST9 and ST8 were most prevalent among Chinese *L. monocytogenes* isolates. This is in agreement with the most prevalent *L. monocytogenes* ST isolated from confiscated Chinese meat samples in the current study. Searching for *L. monocytogenes* isolates from China in the Institute Pasteur database, only one *L. monocytogenes* ST8, isolated in 2013 from Chinese meat, could be detected. Two human cases caused by ST8 occurred in Spain in 2013/2014. For *L. monocytogenes* ST308 (genetic lineage I), ST37, ST155, ST199 and ST378 (genetic lineage II), each isolated once in meat samples from Nepal, Ukraine, Brazil, Morocco and Columbia, no matching actual STs were available at the MLST database for further comparison. The worldwide and EU-wide most frequently isolated *Salmonella* serovars in human cases are *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* (EFSA, European Food Safety Authority and ECDC, European Centre for Disease Prevention, Control, 2014; Hendriksen et al., 2011; Hugas and Beloeli, 2014). Reported human case numbers of *S. Enteritidis* have decreased, but monophasic *S. Typhimurium* 1,4[5],12:i:- are steadily increasing (7.2%) and were related to recent foodborne outbreaks (EFSA, European Food Safety Authority and ECDC, European Centre for Disease Prevention, Control, 2014; Gossner et al., 2012; Mody et al., 2014; Threlfall et al., 2014). This trend was also observable in this study, as the highest percentage of *Salmonella* serovars was assigned to monophasic *S. Typhimurium* 1,4[5],12:i:- (27.3%), originating from Bolivian and Peruvian food samples, followed by *S. Raulorm* and *S. Anatum* (each 18.2%). *Salmonella* serovars clustered in separate PFGE profiles and were indistinguishable within the group (Fig. 3). This is in agreement with previous findings showing that *S. Typhimurium* 1,4[5],12:i:- is highly clonal (Huehn et al., 2009). Interestingly, the three isolates were resistant to ciprofloxacin and one of them also to nalidixic acid. Huehn et al. (2009) reported that all 56 tested *S. Typhimurium* 1,4[5],12:i:- isolates were fully susceptible to 17 antimicrobial agents. Our results demonstrate that the serovar can acquire resistance determinants. Emergence of multidrug resistant clonal lineages of *Salmonella* spp. is a public health concern as they are isolated with increasing frequency, and now they seem to be prevalent in several countries worldwide (Abd-Elghany et al., 2014; Mourão et al., 2014). In this study, none of the *Salmonella* isolates recovered were multiresistant. Indeed, 63.6% of all isolates were fully susceptible to all 29 antimicrobials

tested. This finding suggests that, at the moment, the multiresistant lineages are not widely distributed.

In conclusion, this study reveals the presence of foodborne pathogens (10% for *L. monocytogenes* and 5.5% for *Salmonella* spp.) in food confiscated from non-EU flights passengers. The isolates obtained were genetically diverse and displayed antibiotic resistance (in some case multidrug resistance). International travel may play a major role in the prevalence and dissemination of successful clones of pathogenic bacteria and continuous monitoring of clones involved in such international movements is of major importance to better understand clonal evolution and the emergence and dissemination of successful lineages.

Conflict of interest

All the authors of this manuscript state that there are not any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) our work.

Acknowledgments

This work was supported by the EU 7th Framework Programme under the project PROMISE (project number 265877). We thank Dr. Nigel Cook (FERA) for the critical review of the revised draft of the manuscript, and Mrs. Teresa Moradillo for her technical support. Additionally, we would like to thank the Institute Pasteur for providing the MLST database of *L. monocytogenes* in the Genotyping of Pathogens and Public Health Platform.

References

- Abd-Elghany, S.M., Sallam, K.I., Abd-Elhalek, A., Tamara, T., 2014. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol. Infect.* 1–7.
- Chenal-Francoise, V., Lopez, J., Castinelli, T., Carru, V., Tran, C., Leclercq, A., Lecuit, M., Brisse, S., 2011. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1110.
- Diaz, J.H., 2011. Infection Disease Transmission during Air Travel. *British Travel Health Association Journal* 16, p. 7.
- Doornik, M., Buchsner, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819–3822.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention, Control), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12, 3547 (312 pp).
- Gossner, C., Van Caesteren, D., Le Hellou, S., Wirth, F., Terrien, E., Tevaear, S., Janin, C., Bissabois, A., Durch, V., Vaillant, V., 2012. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4[5], 12: i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Eurosurveillance* 17.
- Graves, L.M., Swaminathan, B., 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 55–62.

- Grimont, P.A.D., Weill, F.-X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Haae, J.K., Didelez, X., Lecuit, M., Korkeala, H., Achtman, M., 2014. The ubiquitous nature of *Listeria monocytogenes* clones: a large-scale multilocus sequence typing study. *Environ. Microbiol.* 16, 405–416.
- Hendriksen, R.S., Viera, A.R., Karlsmose, S., Fu Wong, L., Danilo, M.A., Jensen, A.R., Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infection Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 887–900.
- Huhto, S., Bunge, C., Junken, E., Helmsch, R., Malorny, B., 2009. Poultry-associated *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,12:c – reveals high clonality and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1011–1020.
- Hugan, M., Bekoel, P., 2014. Contrasting *Salmonella* along the food chain in the European Union – progress over the last ten years. *Eurosurveillance* 19, 20004.
- ISO, 1996. ISO 11290-1:1996. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection Method. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2001. ISO 16654: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff – Horizontal Method for the Detection of *Escherichia coli* O157. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2002. ISO 6579:2002. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff – Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2004. ISO 11290-1:1996/AmD 1:2004. Modification of the Isolation Media and the Haemolysis Test, and Inclusion of Precision Data. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2006. Iso 10272-1: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff – Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection Method. International Organisation for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Leclercq, A., Chetail-Francoeur, V., Diney, H., Cantinelli, I., Drafi, R., Brisse, S., Lecuit, M., 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile Pfb-v1. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 74–77.
- Mangili, A., Gendreau, M.A., 2005. Transmission of infectious diseases during commercial air travel. *Lancet* 365, 989–996.
- Mohy, R., Meyer, S., Torres, E., White, P., Nguyen, T., Szwabdzky, R., Henao, O., Lafon, P., Austin, J., Azam, L., 2014. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype 14,5,12:c – infections: the challenges of hypothesis generation and microwave cooking. *Epidemiol. Infect.* 142, 1050–1060.
- Mourão, J., Machado, J., Novais, C., Antunes, F., Petke, L., 2014. Characterization of the emerging clinically-relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4, [5],12:c – (monophase variant of *S. Typhimurium*) clones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1–8.
- Osei, K.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 79–86.
- Ragon, M., Werth, T., Hollandt, F., Laverie, R., Lecuit, M., Le Moennec, A., Brisse, S., 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 4, 1–14.
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gantson, R., Cameron, D.N., Hamer, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 58–67.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Esteve, T., Hoorfar, J., Pla, M., 2003. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *J. Microbiol. Methods* 54, 381–390.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scorti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A., Pla, M., 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of hly_{iap} and invS2483 targets and Amplifluor technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1366–1377.
- Rodríguez-Lázaro, D., Pla, M., Scorti, M., Morzi, H.J., Vázquez-Boland, J.A., 2005. A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. *Appl. Environ. Microbiol.* 9008–9012.
- Schaff, R.L., 2012. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J. Food Prot.* 75, 123–131.
- Shreffler, E., Wain, J., Peters, T., Lane, C., De Pinna, E., Little, C., Wales, A., Davies, R., 2014. Egg-borne infections of humans with *Salmonella*: not only an *S. enteritidis* problem. *World Poultry Sci. J.* 70, 15–26.
- Velasamy, V., Arshak, K., Korotkynska, O., Ojima, K., Adley, C., 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biosens. Bioelectron. Adv.* 28, 232–254.
- Wang, Y., Zhao, A., Zhu, R., Lan, R., Jin, D., Cai, Z., Wang, Y., Li, Z., Wang, Y., Xu, J., 2012. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China. *BMC Microbiol.* 12, 178.

Web References

- Comparing partitions website <http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home> (Last accessed 03 August 2014).
- Institute Pasteur. *L. monocytogenes* MLST database. PFGE genotyping of pathogens and public health platform <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/Pf8/mlst/linos.html> (accessed on: 24 April 2014).



*Francisella
tularensis*

Sección 3.4

Sección 3.4.1

Molecular Investigation of Tularemia Outbreaks in Spain, 1997-2008

Jaime Ariza-Miguel^{1,6}, Anders Johansson², María Isabel Fernández-Natal³, Carmen Martínez-Nistal⁴, Antonio Orduña⁵, Elías F. Rodríguez-Ferri⁶, Marta Hernández¹, and David Rodríguez-Lázaro¹

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León, Carretera de Burgos km. 119, C.P. 47071 Valladolid, Spain; ²Umeå University, Sweden; ³Complejo Asistencial Universitario de León, Spain; ⁴Laboratorio Regional de Sanidad Animal, Spain; ⁵Universidad de Valladolid, Spain; ⁶Universidad de León, Spain

Molecular Investigation of Tularemia Outbreaks, Spain, 1997–2008

Jaime Ariza-Miguel, Anders Johansson, Maria Isabel Fernández-Natal, Carmen Martínez-Nistal, Antonio Orduña, Elías F. Rodríguez-Ferri, Marta Hernández, and David Rodríguez-Lázaro

Tularemia outbreaks occurred in northwestern Spain in 1997–1998 and 2007–2008 and affected >1,000 persons. We assessed isolates involved in these outbreaks by using pulsed-field gel electrophoresis with 2 restriction enzymes and multilocus variable number tandem repeat analysis of 16 genomic loci of *Francisella tularensis*; the cause of this disease. Isolates were divided into 3 pulsotypes by pulsed-field gel electrophoresis and 8 allelic profiles by multilocus variable number tandem repeat analysis. Isolates obtained from the second tularemia outbreak had the same genotypes as isolates obtained from the first outbreak. Both outbreaks were caused by genotypes of genetic subclade B.Br:FTNF002–00, which is widely distributed in countries in central and western Europe. Thus, reemergence of tularemia in Spain was not caused by the reintroduction of exotic strains, but probably by persistence of local reservoirs of infection.

Tularemia is a zoonosis caused by the gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. *F. tularensis* is a highly contagious facultative intracellular pathogen and has infectious doses as low as 10–50 bacteria; it is transmitted by inhalation, direct contact with infected animals, or ingestion of contaminated water or food. The number of species susceptible to infection by this agent is higher than for any other known zoonotic pathogen (1). Because of its potential to cause adverse public health effects and mass casualties by bioterrorist attack, the pathogen is 1 of 6 agents listed as a Tier 1 agent by the US Department of Health and Human Services (2).

Author affiliations: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain (J. Ariza-Miguel, M. Hernández, D. Rodríguez-Lázaro); Umeå University, Umeå, Sweden (A. Johansson); Complejo Asistencial Universitario de León, León, Spain (M.I. Fernández-Natal); Laboratorio Regional de Sanidad Animal León, Valladolid (C. Martínez-Nistal); Universidad de Valladolid, Valladolid (A. Orduña); Universidad de León, León (E.F. Rodríguez-Ferri); and Universidad de Burgos, Burgos, Spain (D. Rodríguez-Lázaro)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2005.130654>

F. tularensis includes 4 subspecies (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, and *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*), which show marked differences in many epidemiologic features, including geographic distribution, virulence, and genetic diversity (3). *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Jel-lison type A) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Jel-lison type B) are major clinical pathogens. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is the most virulent subspecies and can cause life-threatening disease; its distribution seems to be restricted to North America, although a single report indicated its presence in Europe (4–7). *F. tularensis* subsp. *holarctica* causes a less severe disease, and although widespread throughout the Northern Hemisphere, it has restricted genetic diversity, which suggests recent emergence and successful geographic spread (5,7–9).

Tularemia was first reported in Spain in 1997, when it caused one of the largest outbreaks in humans ever described (10). Overall, 559 cases were confirmed during June 1997–April 1998 in 10 provinces. The outbreak was associated with hunting and handling of hares (*Lepus europaeus*) in northwestern Spain. The most common clinical form was ulceroglandular tularemia (55.4%); glandular (15.3%) and typhoid forms (6.6%) of the disease also occurred frequently. A second major human outbreak in humans, which affected 507 persons, occurred in the same area in 2007 and 2008, but in a different epidemiologic context. Its timing coincided with a population peak of the common vole (*Microtus arvalis*), and the most frequent clinical forms of the disease were typhoidal and pneumonic (65% of the cases), which is consistent with infection being acquired through inhalation of *F. tularensis* (11–13). Sporadic tularemia cases and small outbreaks were reported during 2000–2006 in the interval between the 2 major outbreaks in northwestern Spain (13,14).

We report comparative genetic analyses of *F. tularensis* cultured from humans and animals during the 2 main tularemia outbreaks (1997–1998 and 2007–2008). We also

studied *F. tularensis* isolates circulating in Spain during outbreaks with different epidemiologic patterns and investigated whether reemergence of the pathogen after 10 years of no epidemiologic activity was caused by introduction of exotic strains or by establishment of the pathogen in local reservoirs of infection.

Methods

F. tularensis Isolates, Culture Conditions, and Biochemical Characterization

We studied 109 *F. tularensis* isolates: 37 animal and human *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates from the first outbreak in northwestern Spain (1997–1998); 61 animal and human isolates from the second tularemia epidemic in the same area (2007–2008); 10 isolates obtained in the Czech Republic; and reference strain *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu (CAPM 5600). Source of isolates, subspecies, host, geographic origin, and year of isolation are shown in the online Technical Appendix (wwwnc.cdc.gov/EID/article/20/5/13-0654-Techapp1.xlsx).

All isolates were grown on modified Thayer-Martin agar plates containing 36 g/L GC agar base, 10 g/L soluble hemoglobin powder, and 2 vials/L Vitox supplement (Oxoid, Basingstoke, UK) at 37°C for 2–3 days in aerobic conditions. Biochemical characterization included tests for oxidase and catalase activities, glucose and glycerol fermentation, and urea hydrolysis.

Genetic Characterization

Species and subspecies were identified by real-time and conventional PCRs specific for the *fopA* gene and the region of difference 1 (RD1) as described (15,16). RD23 was analyzed by PCR for identification of a genetic group of isolates that had been found on the Iberian Peninsula (17).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) were used to classify isolates into genetic subpopulations. The PFGE protocol described (18), which used restriction enzymes *XhoI* and *BamHI*, was optimized to provide major improvements in quality of fingerprint patterns.

Bacterial cells were suspended in SE buffer (25 mmol/L EDTA, 75 mmol/L NaCl, pH 7.5) to an absorbance of 0.5–0.6 at 600 nm. Cells were lysed in agarose plugs and plugs were washed 5 times with Tris-EDTA buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) for 30 min at 50°C. DNA in the plugs was digested with 40 U of *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) or 40 U of *BamHI* (New England Biolabs), for 16 and 3 h, respectively, at 37°C following the manufacturer's protocol. DNA fragment sizes were determined by electrophoresis and by comparing bands with a Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

MLVA was performed as described for 16 variable number tandem repeat loci (5). To ensure analysis of identical genetic material by PFGE and MLVA, we used DNA from the same culture for both methods. MLVA markers were amplified by using PCR, and sizes of amplification products were determined by electrophoresis on 3.5% high-resolution agarose MS-8 gels (Conda Pronadisa, Madrid, Spain), except for Ft-M3, Ft-M21, Ft-M22, and Ft-M24 MLVA markers, for which the sizes were determined by using capillary electrophoresis. At least 2 alleles were sequenced for each MLVA marker to confirm that size differences observed resulted from the expected variations in numbers of tandem repeats. Forward and reverse sequences were aligned by using MEGA v.4 software (19), and consensus sequences were used to predict the number of tandem repeats in each allele.

Data Analyses

The Simpson index of diversity, which measures the probability that 2 unrelated strains from the test population will be classified into different typing groups (20), was calculated to compare the discriminative power of PFGE typing with that of MLVA for assessing genetic diversity among isolates. The adjusted Wallace coefficient for quantification of agreement between PFGE typing and MLVA results was also calculated. Both analyses were performed by using Comparing Partitions (21).

PFGE patterns were analyzed by using BioNumerics v.6.6 (Applied-Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) to describe genetic relationships among isolates. Dendrograms were constructed by using the Dice similarity coefficient and the unweighted pair group mathematical average clustering algorithm. MLVA data, expressed as allelic profiles for isolates, were analyzed by using BioNumerics v.6.6. Minimum spanning trees were calculated with priority rules set at first link allelic profiles and maximum numbers of single-locus variants and then maximal numbers of single-locus variants and double-locus variants. MLVA types were classified as members of a clonal complex if they had the same allele at 15 of the 16 MLVA markers. A map of the distribution of isolates showing the geographic origin and number of isolates per province was generated by using ArcGIS v.9.2 software (ESRI, Redlands, CA, USA).

Results

Subspecies and Genetic Subclade of *F. tularensis* Isolates

All isolates were negative for oxidase activity, weakly positive for catalase activity, and positive for acid production from glucose; none of the isolates hydrolyzed urea. Only the reference strain *F. tularensis* subsp. *tularensis*

Schu (CAPM 5600) produced acid from glycerol. Real-time PCR specific for the *fopA* gene and size determination at the RD1 region showed that all isolates from Spain and the Czech Republic were *F. tularensis* subsp. *holartctica* (online Technical Appendix). All isolates from Spain included in this study had the 1.59-kbp deletion at the RD23 loci, which is characteristic of the *F. tularensis* subsp. *holartctica* genetic subclade B.Br:FTNF002-00 (also known as the Iberian clone or the central and western European genetic group).

Characterization by PFGE

All 107 *F. tularensis* subsp. *holartctica* isolates showed the same fingerprint pattern by PFGE with the restriction enzyme *XhoI*, irrespective of their geographic origin, host, or date of isolation (isolate TU41 was not typeable by PFGE analysis). This pattern consisted of ≈ 20 DNA fragments >70 kbp. The *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain Schu (CAPM 5600) showed a different banding pattern.

In contrast, PFGE with the restriction enzyme *BamHI* discriminated 5 genotypes among the *F. tularensis* subsp. *holartctica* isolates. *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain Schu (CAPM 5600) showed a highly unrelated banding pattern with maximal pairwise distance to all other isolates. The *BamHI* patterns consisted of 20–24 DNA fragments with a size range of 20–245 kbp. All *F. tularensis* subsp. *holartctica* genotypes were closely related (93.3% similarity), and there were only 1-band differences between pulsotypes (Figure 1, Appendix, wwwnc.cdc.gov/EID/article/20/5/13-0654-F1.htm).

Sixty-nine (63.9%) isolates from Spain clustered into pulsotype A and 26 (24.1%) other isolates from Spain clustered into pulsotype B. All isolates from the Czech Republic, except for isolate CAPM 5538, had the same fingerprint pattern, which was designated pulsotype D (8.3%). Isolate CAPM 5538 showed a pulsotype

that clustered with the 2 remaining isolates from Spain (TU8 and TU9) in pulsotype C (1.9%). One isolate from Spain, TU41, could not be genotyped by PFGE despite several attempts (online Technical Appendix).

There were some discrepancies between our findings and those reported for the 37 isolates in Spain from 1997 (18). Improvements in quality of fingerprint patterns enabled us to distinguish between isolates from Spain and those from the Czech Republic by using PFGE and restriction enzyme *BamHI*. Furthermore, isolates TU3, TU17, TU21, and TU25 were unequivocally assigned to pulsotype B instead of pulsotype A. In instances of discrepancy, analyses were repeated in triplicate with new cultures, and the findings reported were confirmed. Distribution of the 107 *F. tularensis* subsp. *holartctica* isolates into 4 pulsotypes resulted in a Simpson index of diversity of 0.522. There was no obvious correlation between the pulsotype of an isolate from Spain and its geographic origin, host, or tularemia outbreak with which it was associated.

Characterization by MLVA

The allele-based analysis of genetic relationships identified 13 MLVA types among the 108 *F. tularensis* subsp. *holartctica* isolates and showed that *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain Schu (CAPM 5600) was more distantly related (Figure 2). The 10 isolates from the Czech Republic were assigned to 5 MLVA types, which differed from isolates from Spain by ≥ 2 alleles. Marker Ft-M3 provided the highest number of alleles (6). Six copy numbers were detected among the 109 isolates; for Ft-M6, Ft-M9, and Ft-M20, there were 3 copy numbers. Markers Ft-M5, Ft-M7, Ft-M8, Ft-M10, Ft-M13, Ft-M16, Ft-M19, Ft-M21, Ft-M22, Ft-M23, and Ft-M24 each had 2 alleles; these markers with 2 alleles, except for Ft-M24, discriminated only *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain Schu (CAPM 5600) from all isolates of *F. tularensis* subsp. *holartctica* (Table).

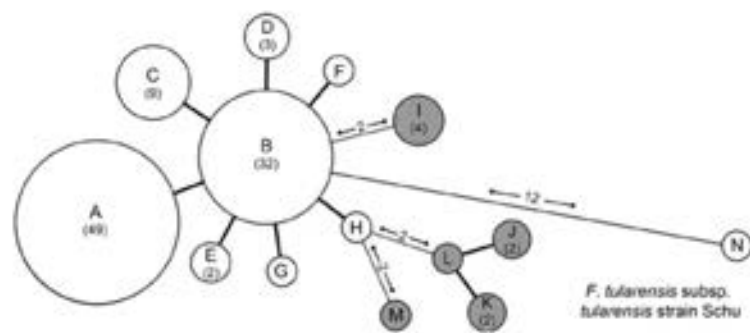


Figure 2. Minimum-spanning tree based on multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) genotypes, showing genetic relationships among 98 *Francisella tularensis* subsp. *holartctica* isolates from Spain (white circles), 10 *F. tularensis* subsp. *holartctica* reference isolates from the Czech Republic (gray circles), and reference strain *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu (CAPM 5600). Each node represents a unique MLVA type, and size is proportional to the number of isolates with that genotype (values in parentheses). Numbers on lines indicate number of typing markers that were different between genotypes. A 1-marker difference is indicated by a thick line.

Table. Multilocus variable number tandem repeat analysis of 98 *Francisella tularensis* isolates from Spain and 11 reference isolates*

MLVA genotype	No. isolates (origin)	No. MLVA markers that discriminated <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> isolates				
		Ft-M3	Ft-M6	Ft-M9	Ft-M20	Ft-M24†
A	49 (Spain)	5	4	2	3	2 (Δ16 bp)
B	32 (Spain)	4	4	2	3	2 (Δ16 bp)
C	9 (Spain)	6	4	2	3	2 (Δ16 bp)
D	3 (Spain)	3	4	2	3	2 (Δ16 bp)
E	2 (Spain)	4	7	2	3	2 (Δ16 bp)
F	1 (Spain)	4	4	2	4	2 (Δ16 bp)
G	1 (Spain)	4	4	3	3	2 (Δ16 bp)
H	1 (Spain)	7	4	2	3	2 (Δ16 bp)
I	4 (former Czechoslovakia)	4	6	2	3	2
J	2 (Czech Republic)	5	7	2	3	2
K	2 (Czech Republic)	6	7	2	3	2
L	1 (former Czechoslovakia)	7	4	2	2	2
M	1 (Czech Republic)	7	7	2	3	2
N‡	1 (United States)	28	4	4	3	1

*MLVA, multilocus variable number tandem repeat.

†All isolates from Spain had the unique 16-bp deletion at marker Ft-M24 that is characteristic of genetic subclone B.Br:FTNF002-00 (Iberian clone).

‡Genotype N, *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain Schu, showed additional unique alleles at the following MLVA markers: Ft-M5, Ft-M7, Ft-M8, Ft-M10, Ft-M13, Ft-M16, Ft-M19, Ft-M21, Ft-M22, and Ft-M23.

Ft-M24 had a 464-bp allele that was found in all isolates from Spain analyzed in this study, but was not present in any other isolates. Ft-M24 has been found only in isolates of genetic subclone B.Br:FTNF002-00 (the Iberian clone or the central and western European genetic group). Sequence analysis of the Ft-M24 DNA fragment showed that the unique allele size was caused by deletion of a 16-bp sequence adjacent to 2 copies of the Ft-M24 tandem repeat (GenBank accession no. KC696513). For marker Ft-M12, because all 109 isolates had the same copy number, this marker provided no typing resolution. Distribution of *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates among 12 MLVA types was uneven; >70% of the isolates in the MLVA types A (49 isolates, 45%) and B (32 isolates, 29.4%) (Table). Simpson index of diversity, which showed the discriminatory power of MLVA for the 108 *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates, was 0.708.

The 98 isolates from Spain were classified into 8 MLVA types, which essentially grouped as 2 closely related clonal complexes that differed at only 1 of the 16 MLVA markers (Figure 2). All MLVA types from Spain were single-locus variants of MLVA type B, which indicated this type was the founder genotype of *F. tularensis* that caused tularemia in northwestern Spain. No clear relationship was found between genotype and geographic origin (Figure 3), source of infection, or host in Spain. The same genotype was usually isolated from hares, voles, and humans in Spain.

Comparison of isolates from the 2 outbreak periods (37 isolates for 1997–1998 and 61 isolates for 2007–2008) showed that the same *F. tularensis* genotypes caused tularemia in both outbreaks (Figure 4). Isolates from the second outbreak showed less genetic diversity than those from the first outbreak (Simpson indices 0.62, 95% CI 0.53–0.71 and 0.66, 95% CI 0.57–0.75, respectively; the difference was not significant at the 95% level).

Comparison of allele distribution at the most variable marker (Ft-M3) showed an overall similarity between isolates causing the outbreaks, although the most common copy number was 4 during the first outbreak and 5 during the second outbreak, which might indicate a stepwise increase in copy number over time. Overall, our findings for 37 isolates from the first outbreak were consistent with the data reported by Dempsey et al. (17) although there were 2 discrepancies. First, isolate TU18 had a unique allele with 3 tandem repeats at Ft-M9, which distinguished this isolate from all other *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates. Second, isolate TU31 had the same Ft-M10 allele as all other isolates. We confirmed our results for these discrepancies in triplicate.

Quantification of Agreement between PFGE Typing and MLVA

Congruence of the 2 methods (PFGE typing and MLVA) for isolate classification was weak for the 107 *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates (1 of the 108 isolates was excluded because it was not typeable by PFGE analysis). This finding was true for reverse comparisons of both methods: if 2 isolates were in the same PFGE pulsotype; they had an 18% chance of having the same MLVA type. Conversely, having the same MLVA type was associated with a 40% chance of having the same PFGE pulsotype. The adjusted Wallace coefficient for PFGE versus MLVA was 0.18 (95% CI 0.04–0.32) and that for MLVA versus PFGE was 0.40 (95% CI 0.20–0.58).

Discussion

F. tularensis subsp. *holarctica* has shown limited genetic diversity worldwide (5,7,22,23). This finding might be the result of a relatively recent bottleneck or clonal expansion event that drastically reduced genetic variation of the bacterial population (5,7). Consistent with previous

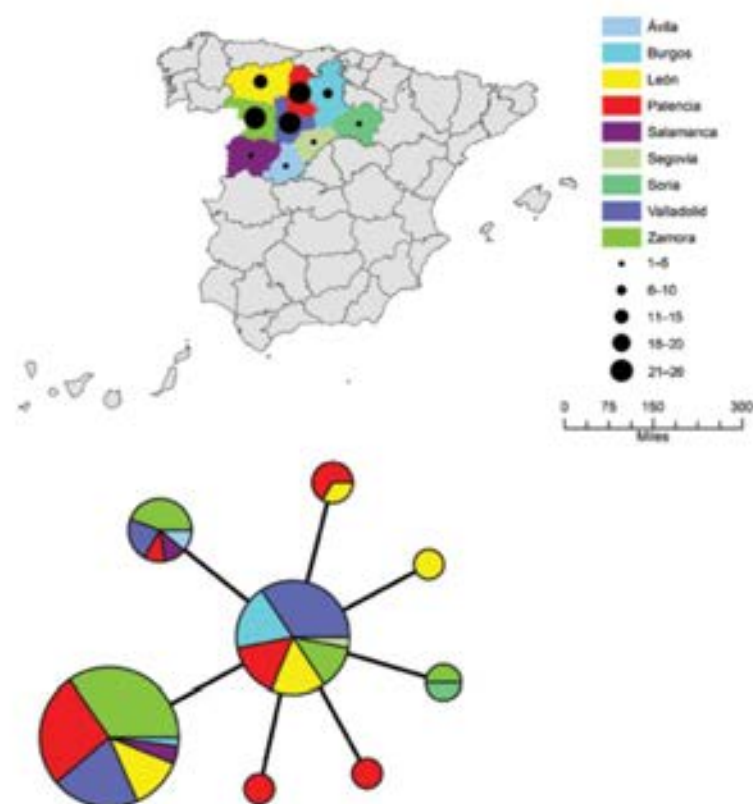


Figure 3. A) Geographic distribution of 98 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolates from Spain. Color codes represent geographic origin, and black circles represent number of isolates recovered per province. B) Minimum-spanning tree based on multilocus variable number tandem repeat (MLVA) analysis of genotypes, showing genetic relationships among 98 *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates from Spain. Each circle represents a unique MLVA type and size of each node is proportional to the number of isolates of that type. The MLVA types are colored according to the geographic origins of the isolates with the same color code as in panel A.

findings, we observed extremely limited genomic diversity among the 98 *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates from Spain analyzed by 2 genotyping tools: PFGE with 2 restriction enzymes and MLVA at 16 highly variable tandem repeat loci. PFGE identified 3 genotypes with single band differences (93.3% similarity) (Figure 1). MLVA discriminated these isolates into 8 MLVA types, but in pairwise comparisons they differed at no more than 2 of 16 MLVA markers. Thus, our collection shows extreme genetic homogeneity (Figure 2).

An *F. tularensis* subsp. *holarctica* lineage in central and western Europe (France, Spain, and Switzerland) has been defined (7,17,24,25). Strains belonging to this lineage have 2 unique genetic traits: a 1.59-kbp genomic deletion at the RD23 locus and a unique 464-bp allele at Ft-M24. All isolates from Spain had these alleles, irrespective of the outbreak, geographic origin, or the host from which they were recovered. Thus, all isolates from Spain analyzed belong to the genetic subclade B.Br:FTNF002-00 (the Iberian clone or central and western European genetic group) (7). Furthermore, all MLVA types for isolates from Spain

were single-locus variants of MLVA type B, which suggested that this type might be a founding genotype that has evolved into multiple other genotypes that differ from the founding genotype at a single loci. In this scenario, all strains causing tularemia outbreaks in Spain are linked to this founder (ancestral) genotype.

We found poor congruence between typing results of PFGE and MLVA for 107 *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates. However, the 2 methods might indicate different types of genetic variation. PFGE is a suitable approach for detecting rearrangements in a genome, and differences of only 1 band observed among the 98 isolates from Spain are presumably consequences of a single mutation event that might be an inversion, translocation, deletion, or a single-nucleotide polymorphism (26). In contrast, MLVA detects variation in several, fast-evolving, repeated sequences. However, such rapidly evolving sequences are susceptible to homoplasy, and genetic classification of isolates on the basis of a difference at only 1 of 16 genetic loci, as for isolates from Spain, could be biased because of genetic reversion events.

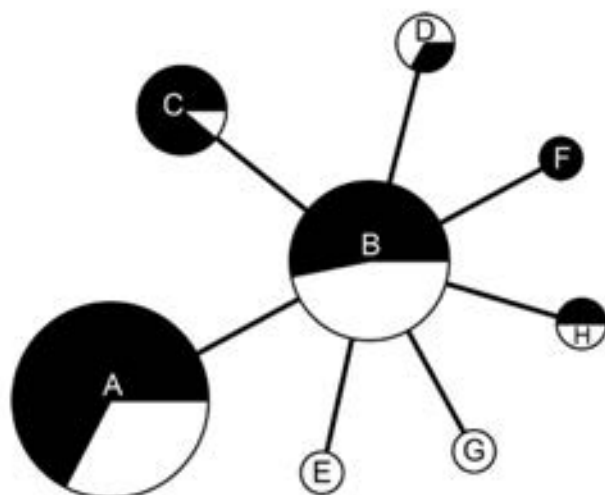


Figure 4. Minimum-spanning tree based on multilocus variable number tandem repeat (MLVA) analysis of genotypes showing genetic relationships among 98 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolates from Spain with reference to 2 human tularemia outbreaks in 1997–1998 and 2007–2008, respectively. White sections in circles indicate *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolates recovered during the first human tularemia outbreak (1997–1998), and black sections indicate isolates recovered during the second outbreak (2007–2008). Each circle represents a unique MLVA type and size is proportional to the number of isolates of that type.

Because some of the mutations detected by PFGE or MLVA might not be selectively neutral, we might have observed time-dependent mutations that are transient on evolutionary time scales and will frequently be eliminated by selection pressure acting on them (27). If this hypothesis is true, use of single mutations for genetic discrimination may lead to incorrect phylogenetic inferences. Therefore, poor congruence between PFGE and MLVA for identifying genetic subclade B.Br:FTNF002–00 of *F. tularensis* subsp. *holarctica* in Spain might be caused by limited bacterial diversity. Use of more extensive genetic analyses for typing, such as whole genome sequencing, might be useful in subsequent molecular epidemiology studies.

In Spain, tularemia was first reported in late 1997 in association with one of the largest human outbreaks ever described (10). The most common route of infection of humans was by direct contact when hunting and handling hares (*L. europaeus*). Consistent with infection with *F. tularensis* through the skin, the most frequent clinical form was ulceroglandular tularemia (55.4%); glandular (15.3%) and typhoid (6.6%) forms of the disease were also observed. A second major human outbreak occurred in the same geographic area in northwest Spain in 2007 and 2008 after 10 years of no epidemiologic activity. The epidemiology of the second outbreak was different from that of the first outbreak. The second outbreak occurred when the population of the common vole (*Microtus arvalis*) peaked, and >65% of case-patients had typhoidal and pneumonic forms of tularemia (12,13), which is consistent with infection by inhalation.

Few outbreaks of tularemia caused by airborne transmission of the bacteria have been reported. These outbreaks include a notable outbreak of inhalational tularemia

in Sweden in 1966–1967 associated with environmental exposure of farmers in which >600 cases were diagnosed (28). There were clusters of outbreaks on Martha's Vineyard (Massachusetts, USA) in 1978 and 2000 (29,30) and cases of tularemia caused by airborne transmission to 53 farmers in northern Finland during 1982. (31). In Germany in 2005, a total of 39 participants in a hare hunt were infected after exposure to contaminated droplets generated by rinsing infected hares (32).

Isolates from Spain obtained during the second tularemia outbreak had the same genotypes as those obtained during the first outbreak (Figures 1, 4). Furthermore, we did not observe any relationships between genotype and geographic origin, or host from which the isolates were recovered, which suggested that in that area, the same clones were circulating in all hosts (Figure 3, panel B). These results are useful because the 2 outbreaks had substantial epidemiologic differences (10,12). Our findings indicate that the outbreak in 2007, after 10 years of no epidemiologic activity, was not caused by introduction of a new strain, but by reemergence of an endemic bacterial population that has been circulating in the region for at least the past 15 years. Furthermore, our findings also suggest that clinical forms of the outbreak are determined by ecologic processes involved in infection (e.g., route of infection, infective dose) rather than by the genotype of the pathogen.

In conclusion, we report genetic characterization of *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolated in Spain during 2 of the largest tularemia outbreaks worldwide. There were marked epidemiologic differences between the 2 outbreaks, which were separated by 10 years of no epidemic activity. Molecular investigations showed that both outbreaks were caused

by the same group of closely related genotypes in subclade B.Br:FTNF002-00. Therefore, the reemergence of tularemia in 2007 was presumably not caused by introduction of a new strain, but by persistence of local reservoirs of infection. These findings, along with sporadic cases of tularemia in 1998 and 2007, suggest that local foci of tularemia have become established in Spain. Further investigations will help identify these endemic foci and clarify biotic and abiotic factors that have favored establishment of the pathogen in northwestern Spain.

This study was supported by project PEP 2009/1422 of the Junta de Castilla y León (Spain). A.J. was supported by the Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden within the Nordic European Molecular Biology Laboratory Partnership for Molecular Medicine and by the Västerbotten County Council.

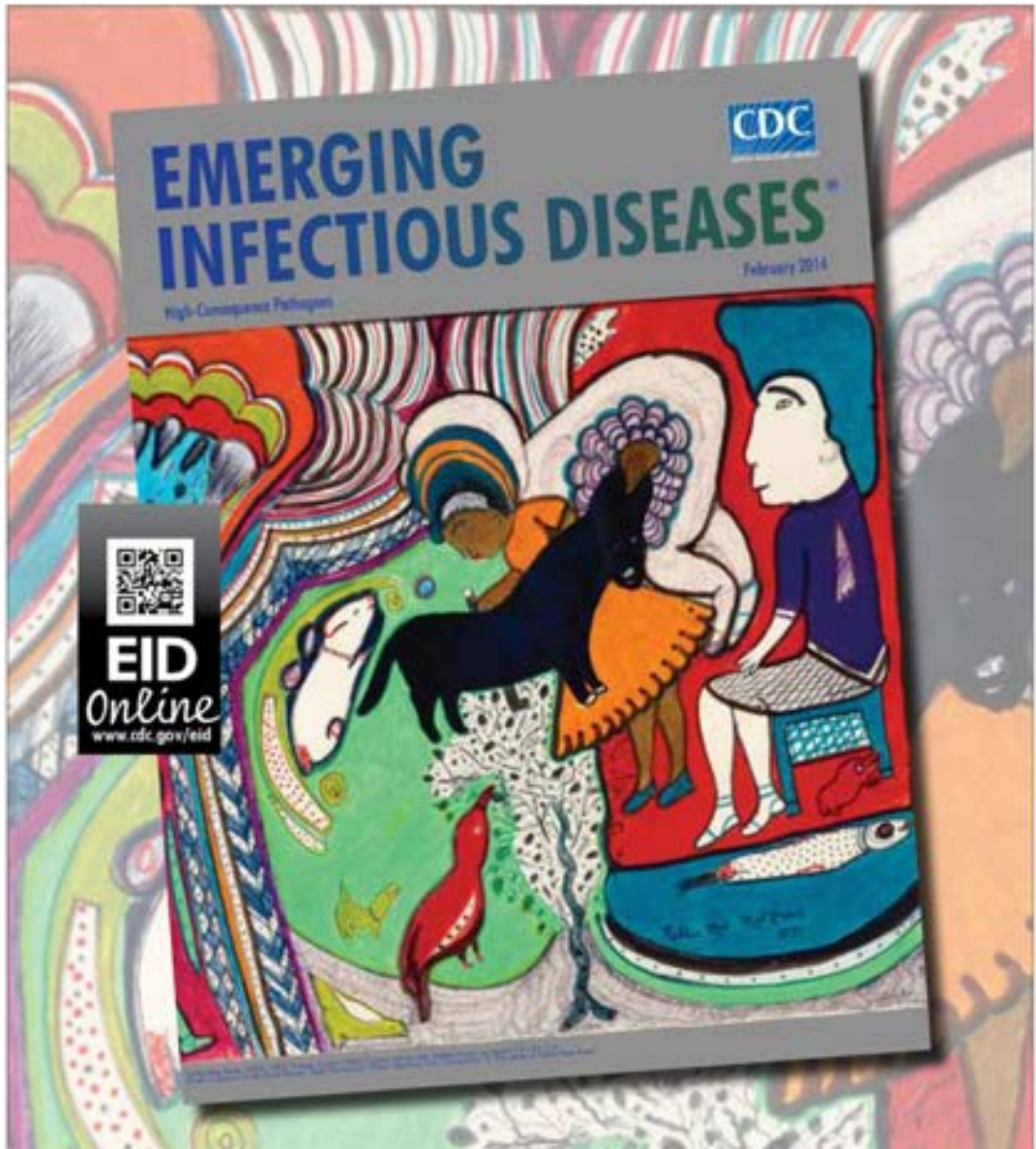
Dr Ariza-Miguel is a biologist and PhD candidate at the Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid, Spain. His primary research interest is emerging infectious diseases.

References

- Hopla CE, Hopla AK. Tularemia. In: Beran GW, Steele JB, editors. *Handbook of zoonoses*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press, Inc.; 1994. p. 113-26.
- Possession, use, and transfer of select agents and toxins; biennial review. Department of Health and Human Services [cited 2013 Apr 23]. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-10-05/html/2012-24389.htm>
- Sjöstedt AB. Family XVII. Francisellaceae, genus I. *Francisella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JJ, Garrity GM, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed., vol. 2 (The proteobacteria), part B (The gamma-proteobacteria). New York: Springer; 2005. p. 200-10.
- Guryová D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol*. 1998;14:797-802. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007537405242>
- Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M, et al. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol*. 2004;186:5808-18. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.17.5808-5818.2004>
- Larsson P, Svensson K, Karlsson L, Guala D, Gramberg M, Forsman M, et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1725-32. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1311.070603>
- Vogler AJ, Birdsall DN, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol*. 2009;191:2474-84. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01786-08>
- Ellis J, Oyston PC, Green M, Tibball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:631-46. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.4.631-646.2002>
- Keim PS, Wagner DM. Humans, evolutionary and ecologic forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:813-21. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2219>
- De Mateo S, Coisin CR. Outbreak of tularemia in Castilla y León, Spain. *Euro Surveill*. 1998. [cited 2013]. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18948>
- Avery FW, Barnett TB. Pulmonary tularemia: a report of five cases and consideration of pathogenesis and terminology. *Am Rev Respir Dis*. 1967;95:584-91.
- Martin C, Gallardo MT, Mateos L, Vian E, Garcia MJ, Ramos J, et al. Outbreak of tularemia in Castilla y León, Spain. *Euro Surveill*. 2007;12:071108.1.
- Allue M, Sopena CR, Gallardo MT, Mateos L, Vian E, Garcia MJ, et al. Tularemia outbreak in Castilla y León, Spain, 2007: an update. *Euro Surveill*. 2008;13:18948.
- Anda P, Segura del Pozo J, Diaz Garcia JM, Escudero R, Garcia Peña FJ, López Velasco MC, et al. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:575-82.
- Broekhuijsen M, Larsson P, Johansson A, Byström M, Eriksson U, Larsson E, et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2924-31. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.7.2924-2931.2003>
- Emanuel PA, Bell R, Dang JL, McClanahan R, David JC, Burgess RJ, et al. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J Clin Microbiol*. 2003;41:689-93. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.2.689-693.2003>
- Dempsey MP, Dobson M, Zhang C, Zhang M, Lion C, Gutiérrez-Martín CB, et al. Genomic deletion marking an emerging subclone of *Francisella tularensis* subsp. *holartica* in France and the Iberian Peninsula. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:7465-70. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00646-07>
- García Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, De La Puente VA, Gutiérrez CB, Hadfield TL, et al. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 2002;40:2964-72. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.8.2964-2972.2002>
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*. 1988;26:2465-6.
- Comparing partitions. Online tool for quantitative assessment of classification agreement [cited 2013 Apr 23]. <http://darwin.phylovis.net/ComparingPartitions/index.php?link=Home>
- Farlow J, Wagner DM, Dukerich M, Stanley M, Chu M, Kubota K, et al. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1835-41. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1112.050728>
- Gyuranecz M, Birdsall DN, Spletstoesser W, Seibold E, Beckstrom-Sternberg SM, Makrai L, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holartica*, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:290-3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1802.111305>
- Vogler AJ, Birdsall DN, Lee J, Vaisaire J, Doujet CL, Lapalus M, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis* sp. *holartica* in France. *Letts Appl Microbiol*. 2011;52:177-80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02977.x>
- Pilo P, Johansson A, Frey J. Identification of *Francisella tularensis* cluster in central and western Europe. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:2049-51. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1512.080805>
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BU, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233-9.
- Ho SY, Lanfear R, Bromham L, Phillips MJ, Soubrier J, Rodrigo AG, et al. Time-dependent rates of molecular evolution. *Mol Ecol*. 2011;20:3087-101. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05178.x>
- Dahlström S, Ringertz O, Zetterberg B. Airborne tularemia in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 1971;3:7-16.

29. Feldman KA, Emcore RE, Lathrop SL, Matyas BT, McGill M, Schriener ME, et al. An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N Engl J Med*. 2001;345:1601–6. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa011374>
30. Teutsch SM, Martone WJ, Brink EW, Potter ME, Eliot G, Hensle R, et al. Pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *N Engl J Med*. 1979;301:826–8. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM.1979.10113011507>
31. Syrjälä H, Kujala P, Myllylä V, Salminen A. Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand J Infect Dis*. 1985;17:371–5.
32. Hauer AM, Hofstetter I, Seibold E, Kaysser P, Eckert J, Neuhäuser H, et al. Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:238–43. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1602.081727>

Address for correspondence: David Rodríguez-Lázaro, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Carretera de Burgos Km. 119, CP 47071, Valladolid, Spain; email: ita-rodrlazaro@itacyles



Technical Appendix. Information on *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* isolates used in this study and results of PFGE and MLVA*

Isolate no.	Originating laboratory	Geographic origin	Year	Host	PFGE			MLVA																	Allelic profile	MLVA type
					XhoI	BamHI	XhoI and BamHI	Ft-M3	Ft-M5	Ft-M6	Ft-M7	Ft-M8	Ft-M9	Ft-M10	Ft-M12	Ft-M13	Ft-M16	Ft-M19	Ft-M20	Ft-M21	Ft-M22	Ft-M23	Ft-M24			
TU1	ALG	Valladolid, Spain	1997	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU2	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU3	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	B	AB	6	2	4	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	B		
TU4	ALG	León, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	C	
TU5	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	B	AB	7	2	4	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	7242222211132410	H		
TU6	ALG	León, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU7	ALG	León, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B		
TU8	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	C	AC	3	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	3242222211132410	D	
TU9	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	C	AC	3	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	3242222211132410	D	
TU10	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU11	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU12	ALG	Zamora, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B		
TU13	ALG	Zamora, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU14	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU15	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU16	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU17	ALG	Segovia, Spain	1998	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU18	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	3	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242232211132410	G	
TU19	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU20	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU21	ALG	Palencia, Spain	1998	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU22	ALG	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU23	ALG	Zamora, Spain	1998	Vole	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU24	HLE	León, Spain	1998	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU25	HZA	Zamora, Spain	1998	Human	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU26	HZA	Zamora, Spain	1998	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU27	HZA	Zamora, Spain	1998	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
CAPM 5536 (Strain 130)	CAPM	Former Czechoslovakia	Unknown	Hare	A	D	AD	4	2	6	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	4262222211132410	I	
CAPM 5537 (Strain 2713)	CAPM	Former Czechoslovakia	Unknown	Hare	A	D	AD	7	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	4	1	2	7242222211122410	L	
CAPM 5600 (Strain Schu)	CAPM	United States	1941	Human	B	F	BF	28	3	4	4	4	4	18	2	2	2	3	3	2	2	1	2344441222233220	N		
TU31	ALG	Valladolid, Spain	1998	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
TU32	ALG	Valladolid, Spain	1998	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU33	ALG	Valladolid, Spain	1998	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A	
TU34	ALG	Palencia, Spain	1998	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B	
CAPM 5151 (Strain T-1/59)	CAPM	Former Czechoslovakia	Unknown	Hare	A	D	AD	4	2	6	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	4262222211132410	I	

Isolate no.	Originating laboratory	Geographic origin	Year	Host	PFGE			MLVA																Allelic profile	MLVA type	
					Xho I	Bam HI	Xho I and Bam HI	Ft-M3	Ft-M5	Ft-M6	Ft-M7	Ft-M8	Ft-M9	Ft-M10	Ft-M12	Ft-M13	Ft-M16	Ft-M19	Ft-M20	Ft-M21	Ft-M22	Ft-M23	Ft-M24			
TU36	LRSA	Palencia, Spain	1998	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
TU37	LRSA	Valladolid, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
TU38	LRSA	Soria, Spain	1998	Hare	A	A	AA	4	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4272222211132410	E	
TU39	LRSA	Zamora, Spain	1999	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
TU40	LRSA	Zamora, Spain	1998	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
TU41	LRSA	Zamora, Spain	1998	Tick	NT	NT	NT	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
6424	LRSA	Palencia, Spain	2007	Vole	A	B	AB	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
6434	LRSA	Zamora, Spain	2007	Vole	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
6455	LRSA	León, Spain	2007	Vole	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7435	LRSA	Palencia, Spain	2007	Vole	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7631	LRSA	Palencia, Spain	2007	Vole	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7806	LRSA	Palencia, Spain	2007	Vole	A	B	AB	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7131	LRSA	Palencia, Spain	2007	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7467	LRSA	Burgos, Spain	2007	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
7912	LRSA	Burgos, Spain	2007	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
7913	LRSA	Burgos, Spain	2007	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
8216	LRSA	Burgos, Spain	2007	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
8393	LRSA	Valladolid, Spain	2007	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
8465	LRSA	Burgos, Spain	2007	Hare	A	B	AB	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
8741	LRSA	Burgos, Spain	2007	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
9231	LRSA	Valladolid, Spain	2007	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
9637	LRSA	Salamanca, Spain	2007	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
9778	LRSA	Valladolid, Spain	2007	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
2212	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
2213	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
2700	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
3267	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
3268	LRSA	Palencia, Spain	2008	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
3269	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
3639	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
3640	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
3641	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
3643	LRSA	Salamanca, Spain	2008	Hare	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
3644	LRSA	Ávila, Spain	2008	Hare	A	B	AB	6	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
3645	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
3646	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A

Isolate no.	Originating laboratory	Geographic origin	Year	Host	PFGE			MLVA																Allelic profile	MLVA type
					XhoI	BamHI	XhoI/BamHI	FT-M3	FT-M5	FT-M6	FT-M7	FT-M8	FT-M9	FT-M10	FT-M12	FT-M13	FT-M16	FT-M19	FT-M20	FT-M21	FT-M22	FT-M23	FT-M24		
3651	LRSA	Salamanca, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
4387	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
4388	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
4389	LRSA	Zamora, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
4390	LRSA	León, Spain	2008	Hare	A	B	AB	3	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	3242222211132410	D
4392	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
4393	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
7013	LRSA	Burgos, Spain	2008	Hare	A	B	AB	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
8041	LRSA	Valladolid, Spain	2008	Hare	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7085916	HLE	León, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7064579	HLE	León, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7072002	HLE	León, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
8063913	HLE	León, Spain	2008	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
7083765	HLE	León, Spain	2007	Human	A	B	AB	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
7070924	HLE	León, Spain	2007	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
7074825	HLE	León, Spain	2007	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	4	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211142410	F
ZA-26454	HVA	Zamora, Spain	2007	Human	A	A	AA	4	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4272222211132410	E
ZA-20208	HVA	Zamora, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
ZA-18752	HVA	Zamora, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
PA-22447	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	A	AA	6	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	6242222211132410	C
PA-25493	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	B	AB	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
PA-25825	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
VA-23287	HVA	Valladolid, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
PA-23313	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
PA-22442	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
PA-24022	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	B	AB	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
PA-21739	HVA	Palencia, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
ZA-07/2645	HVA	Zamora, Spain	2008	Human	A	A	AA	4	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	4242222211132410	B
ZA-26301	HVA	Zamora, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
ZA-07/3592	HVA	Zamora, Spain	2008	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
ZA-20206	HVA	Zamora, Spain	2007	Human	A	A	AA	5	2	4	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2 (Δ16 bp)†	5242222211132410	A
CAPM 5535 (Strain 2062, avirulent)	CAPM	Former Czechoslovakia	1957	Hare	A	D	AD	4	2	6	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	4262222211132410	I
CAPM 5538 (Strain M 62)	CAPM	Former Czechoslovakia	1962	Human	A	E	AE	4	2	6	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	4262222211132410	I
CAPM 6438 (Strain PA3/2011)	CAPM	Czech Republic	2011	Hare	A	D	AD	6	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	6272222211132410	K
CAPM 6440 (Strain PA307/2011)	CAPM	Czech Republic	2011	Hare	A	D	AD	7	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	7272222211132410	M
CAPM 6443 (Strain PA-2305/10)	CAPM	Czech Republic	2010	Hare	A	D	AD	6	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	6272222211132410	K
CAPM 6444 (Strain PA-237/11)	CAPM	Czech Republic	2011	Hare	A	D	AD	5	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	5272222211132410	J
CAPM 6445 (Strain PA-238/11)	CAPM	Czech Republic	2011	Hare	A	D	AD	5	2	7	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	4	1	2	5272222211132410	J

*PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; MLVA, multilocus variable number tandem repeat analysis; ALG, Central Laboratory of Animal Health, Madrid, Spain; HZA, Laboratory of Microbiology, Hospital Virgen de la Concha, Insalud, Zamora, Spain; CAPM, Collection of Animal Pathogenic Microorganisms, Brno, Czech Republic; LRSA, Regional Laboratory of Animal Health, León, Spain; NT, nontypeable; HLE, Department of Medical Microbiology, Hospital Princesa Sofía, Insalud, León, Spain; HVA, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Valladolid, Valladolid, Spain.

†All isolates from Spain had the unique 16-bp deletion at marker FT-M24 that is characteristic of the genetic subclade B.Br:FTNF002-00 (the Iberian clone).

Capítulo 4

Discusión general

La estrategia **One Health** surgió debido a la necesidad de desarrollar un nuevo enfoque que permite abordar problemáticas globales y de gran complejidad, en las que influyen de forma directa e indirecta decenas de factores de múltiple naturaleza (biológicos, ecológicos, económicos, medioambientales, poblacionales, políticos y sociales, entre otros), y que no pueden ser resueltas desde la aproximación clásica que ofrecen las disciplinas que se aplican en la actualidad de forma independiente. Como se expone en la introducción de esta Tesis Doctoral, ni el concepto *One Health*, ni la toma de conciencia sobre la conexión existente entre la Salud Pública, la Sanidad Animal y el Medio Ambiente, son nuevos (Bresalier cols., 2015). Sin embargo, hoy en día existen múltiples factores que han llevado a que la interfaz hombre-animal-medio ambiente esté más interrelacionada que nunca. El aumento exponencial de la población mundial a partir de la segunda mitad del siglo XX, junto con las enfermedades animales que causan pérdidas importantes en la producción (www.rr-africa.oie.int/en/news/index.html), suponen un gran reto para la salvaguardia de la seguridad alimentaria, desde el punto de vista del abastecimiento. Para su consecución, la producción animal ha derivado hacia sistemas intensivos, que requieren del uso de antibióticos en los animales de consumo, lo que a su vez tiene repercusiones importantes en la Sanidad Animal, la Salud Pública y el Medio Ambiente. Además, la ganadería intensiva estrecha las relaciones entre los animales, y entre estos y el hombre, facilitando la emergencia de zoonosis. Estos agentes zoonóticos utilizan los animales y el medio ambiente como reservorio, constituyendo un riesgo biológico, y complicando sobremanera las estrategias diseñadas para su prevención y control. Por otro lado, la presencia de patógenos en los alimentos de origen animal y en el medio ambiente, constituye un riesgo para la inocuidad alimentaria, y por lo tanto para la Salud Pública. Todo ello aderezado con la intensificación del transporte y el comercio internacionales en un mundo extremadamente globalizado, que facilita la dispersión de los patógenos animales, resistencias a antibióticos y agentes zoonóticos por todo el mundo. De hecho, a día 5 de octubre de 2015 se ha firmado el Tratado de Asociación Transpacífico (TTP, por su acrónimo en inglés), en el que Estados Unidos, junto con otras 11 naciones del Pacífico, ha llegado a un acuerdo comercial que representa el 40% de la economía mundial. Asimismo, en el escándalo de WikiLeaks se filtró la negociación en secreto de un tratado homólogo entre Estados Unidos y Europa, el denominado Tratado Transatlántico de Comercio e Inversiones (TTIP), que amenaza con terminar de globalizar el comercio en el mundo. Estas líneas tan solo ejemplifican algunos de los actores principales que conforman el complejo entramado, y las múltiples interrelaciones que existen entre todos los ámbitos que forman parte de la estrategia *One Health* (Figura 5).

Consecuentemente, en esta Tesis Doctoral se han estudiado cuatro patógenos con relevancia en Castilla y León, en el marco de la estrategia *One Health*. Tres de ellos tienen una conexión evidente con la Salud Pública al tratarse de agentes causantes de zoonosis: *S. aureus*, y en especial SARM, *L. monocytogenes* y *F. tularensis*. El cuarto patógeno objeto de estudio, *M. agalactiae*, tiene una conexión más sutil ya que no es capaz de causar enfermedad en humanos de forma directa, sin embargo limita la disponibilidad de proteínas de origen animal, constituyendo por lo tanto un problema de seguridad alimentaria visto desde la óptica del abastecimiento. De esta manera, dentro de las grandes problemáticas actuales que requieren del enfoque de la estrategia *One Health* para su resolución, los patógenos estudiados se engloban dentro del ámbito de la seguridad alimentaria, la resistencia a los antibióticos, la inocuidad alimentaria y los riesgos biológicos (Figura 2, 3, 5).

La **seguridad alimentaria**, desde la acepción más estricta del término, hace referencia a la disponibilidad de alimentos, al acceso de las personas a ellos, y al aprovechamiento biológico de los mismos, y se ha convertido en uno de los mayores retos del siglo XXI debido al aumento exponencial que ha sufrido la población mundial a partir de la segunda mitad del siglo XX. De acuerdo con los últimos datos disponibles en el *The World Bank*, la población superó los 7.200 millones de habitantes en el año 2014, y se estima que superará los 9.000 millones para el 2050 (*The World Bank* webpage). Este crecimiento se está dando fundamentalmente en los países en vías de desarrollo, y junto al incremento de la renta per cápita en estas regiones, está suponiendo a su vez un aumento de la demanda de proteínas de origen animal, que se estima de un 70% de aquí al 2050 (www.fao.org/animal-health/es). Para suplir dicha demanda, el sistema alimentario mundial tiene que cambiar hacia procedimientos más intensivos, especializados e integrados, lo cual es motivo de gran preocupación, en primer lugar, por la sostenibilidad del sistema, en segundo lugar, por las dudas que suscitan las infraestructuras de Salud Pública y Sanidad Animal disponibles en estos países para soportar esta tasa de crecimiento, y en tercer lugar, porque esta evolución hacia prácticas de producción intensivas deriva en un contacto más estrecho entre los animales, y entre estos y el hombre, lo que otorga a los patógenos más oportunidades de saltar la barrera de especie, facilitando la emergencia y dispersión de zoonosis (King, 2012).

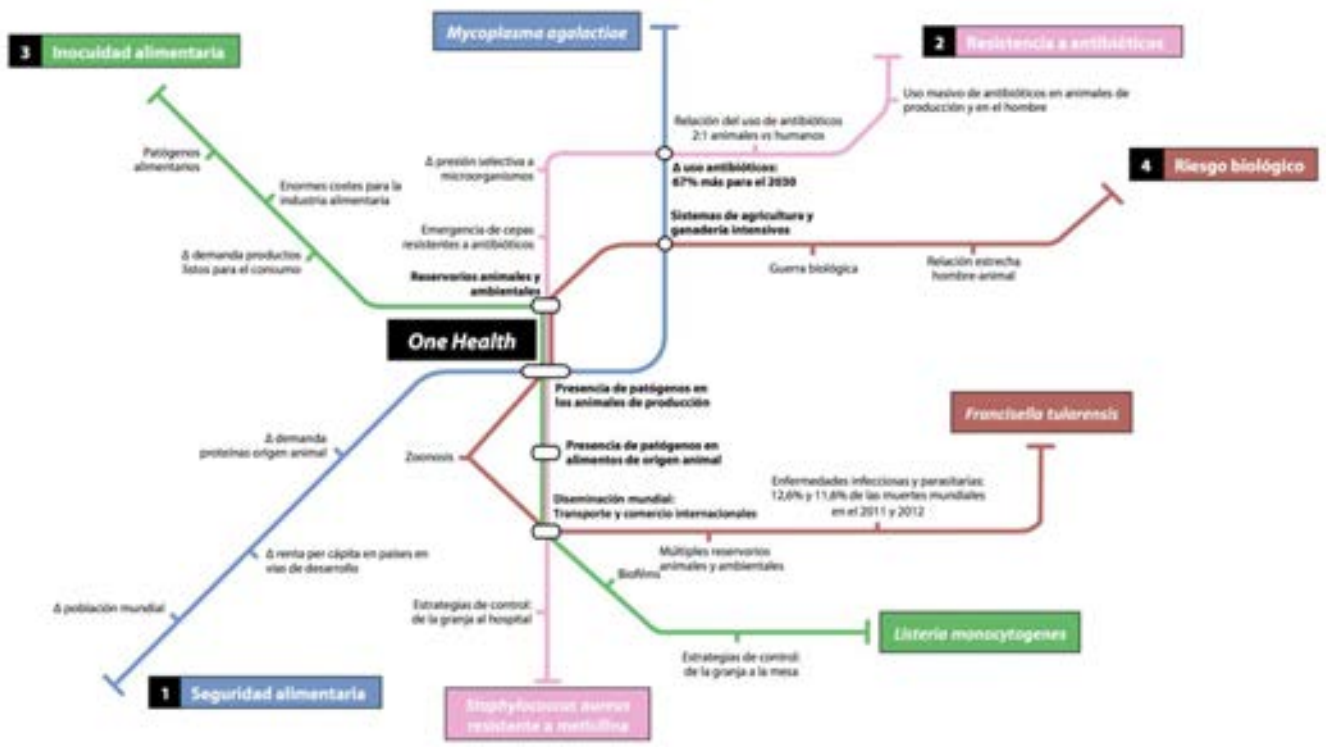


Figura 5. Interrelaciones en la interfaz hombre-animal-medio ambiente en los ámbitos de la seguridad alimentaria, la inocuidad alimentaria, la resistencia a los antibióticos y los riesgos biológicos, en los que se engloban los patógenos objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, dentro del marco de la estrategia *One Health*.

M. agalactiae y *S. aureus* tienen relevancia en este contexto de seguridad alimentaria, al causar pérdidas importantes en la producción láctea de los rumiantes, siendo una de las principales causas de mastitis (Corrales y cols., 2007; Gómez-Martín y cols., 2013; Gelasakis y cols., 2015). Como se describe en la introducción, en Castilla y León se produce el 60% de la leche de oveja de España, por lo que estos dos patógenos tienen un gran impacto socio-económico en la región. En los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral se analizaron 1.798 muestras de leche de 1.313 explotaciones localizadas en 12 provincias: Ávila, Burgos, Cáceres, Cantabria, Ciudad Real, León, Madrid, Palencia, Salamanca, Segovia, Valladolid, Zamora. De ellas, 922 explotaciones fueron muestreadas en una sola ocasión, y las restantes 391 se muestrearon de 2 a 5 veces. Para el cálculo de la prevalencia del patógeno, solo se utilizaron los resultados obtenidos en las explotaciones muestreadas en una ocasión, con el fin de asegurarnos de que todas las granjas contribuían de forma proporcional. Los resultados de las 391 granjas re-muestreadas se utilizaron para evaluar el nivel de excreción intermitente de *M. agalactiae* en la leche.

Se observó una elevada prevalencia de ambos patógenos en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León. Durante los tres años de muestreo (2008-2010), la prevalencia media de *M. agalactiae* fue del 36,8%, con una tendencia ascendente desde el 32,9% en el 2008 hasta el 42,7% en el 2010. Además, el patógeno fue detectado en las 12 provincias muestreadas, lo que demuestra que sigue estando ampliamente distribuido en las explotaciones del noroeste de España, como pasaba al menos desde principios de los años 70 (Talegón-Heras, 1974; Ariza-Miguel y cols., 2012). De hecho, hay que tener en consideración que los resultados de prevalencia obtenidos en este estudio han sido probablemente subestimados, ya que las muestras analizadas procedían de los tanques de mezcla de las explotaciones, con lo cual hay un factor de dilución, y además se ha descrito que los animales infectados presentan una excreción intermitente del patógeno en la leche (Lambert y cols., 1987; Corrales y cols., 2007). Esta hipótesis se ve avalada por los resultados obtenidos en las 391 granjas en las que se realizó más de un muestreo. En total, el 63,9% de estas explotaciones fueron positivas en alguno de los muestreos y, además, el 26% de las granjas que resultaron positivas en un muestreo, dieron un resultado negativo en un re-muestreo posterior, lo que confirma que las ovejas mostraban frecuentemente una excreción intermitente del patógeno en la leche.

Las provincias en las que se detectó el patógeno con mayor frecuencia fueron Ávila (66,7%), Zamora (52,7%) y Valladolid (50,7%), con el 9,9%, el 43,3%, y el 59,5% del

total de explotaciones de ganado ovino muestreadas (Ariza-Miguel y cols., 2012). En los BOE de los años 1972 (BOE, núm. 188, 7 de agosto de 1972, págs. 14311-2), 1973 (BOE, núm. 244, 11 octubre 1973) y 1975 (BOE, núm. 35, 10 febrero 1975, págs. 2810-1), ya se “declaraban las provincias de tratamiento obligatorio contra la AC a la vista de los informes epizootiológicos suministrados por los servicios veterinarios de Sanidad Animal y Jefaturas Provinciales de Producción Animal”, entre las que figuraban un total de 9, 17 y 29 provincias respectivamente (4, 6 y 8 pertenecientes a Castilla y León), con lo que queda de manifiesto que ya por aquella época se era consciente de la magnitud del problema, y se habían establecido programas para la prevención y control del síndrome. Por otro lado, Goncer Coca y cols. (1989) analizaron entre 1980 y 1983 un total de 745 muestras de leche de 20 provincias (con mayor representación de muestras de Toledo, Valladolid y Cuenca), y en el periodo 1984-1986, otras 336 muestras de leche de 13 provincias (principalmente de Madrid, Toledo y Cuenca). De ellas aislaron 141 cepas de *Mycoplasma* spp., siendo Valladolid la segunda provincia con mayor número de cepas aisladas (11,3%), por detrás de Toledo (26,2%). En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el impacto que ha tenido, y que sigue teniendo este síndrome en España, y particularmente en Castilla y León, y la necesidad de establecer medidas eficaces para el control de la AC.

Un aspecto metodológico importante a tener en cuenta, es la dificultad que entraña el aislamiento y detección microbiológica de las especies del género *Mycoplasma* involucradas en la AC en medios de laboratorio. En primer lugar, como se describe en la introducción, se requieren medios selectivos enriquecidos con esteroides para su crecimiento (que por cierto, son muy caros), y su incubación en una atmósfera que imite las condiciones celulares (37°C, 5% CO₂) (Corrales y cols., 2007). En el caso de la detección en muestras de leche cruda, este procedimiento se complica aún más por la gran cantidad de microbiota presente, que posee unas condiciones de crecimiento mucho más rápidas que los micoplasmas, pudiendo por tanto enmascarar su presencia. Además, el pequeño tamaño y el color transparente de las colonias, hace necesaria la utilización de un microscopio para su observación, y requiere de experiencia previa. Todas estas dificultades se ven reflejadas claramente en los resultados de nuestro estudio, en el que 339 de las 922 explotaciones de ganado ovino muestreadas resultaron positivas mediante la detección molecular por PCR a tiempo real (36,8%), mientras que mediante los métodos microbiológicos clásicos tan solo se detectó su presencia en 85 explotaciones (9,2%) (Ariza-Miguel y cols., 2012). Esto nos lleva a dos conclusiones. Por un lado, la metodología utilizada en este estudio, desde la recogida y conservación de las muestras, el

enriquecimiento en caldo de laboratorio selectivo, y la detección molecular mediante el sistema de PCR a tiempo real diseñado por nuestro laboratorio (Oravcová y cols., 2009), constituye un método apropiado para llevar a cabo la monitorización del estado sanitario de los rebaños, que podría ser trasladado directamente a su aplicación en las explotaciones de Castilla y León. Por otro lado, los métodos microbiológicos no deben ser utilizados en exclusiva, ya que tienden a subestimar de forma notable la presencia del patógeno, sino que se deben de complementar con técnicas moleculares y, cuando sea adecuado, serológicas.

Los datos de prevalencia obtenidos en nuestro estudio para el ganado ovino están en consonancia con los observados en el ganado caprino de nuestro país, ámbito en el que el grupo de investigación liderado por el Prof. José Bismarck Poveda Guerrero ha llevado a cabo numerosas investigaciones durante las tres últimas décadas en varias regiones de España, incluyendo las Islas Canarias, Extremadura y la región murciano-granadina (Real y cols., 1994; Gil y cols., 1999; Assunção y cols., 2004; Corrales y cols., 2004; De la Fe y cols., 2005, 2007). Así, De la Fe y cols. (2005) detectaron la presencia de micoplasmas en el 38,5% de las explotaciones de caprino muestreadas, resultado que está en el mismo orden de magnitud que el obtenido en nuestro estudio. Sin embargo, resulta interesante que mientras que en el ganado caprino se han detectado las cuatro especies del género *Mycoplasma* involucradas en el síndrome (Gil y cols., 2003; De la Fe y cols., 2005, 2007), nosotros solo detectamos la presencia de *M. agalactiae* (Ariza-Miguel y cols., 2012). Además, la caracterización molecular de los 410 aislados obtenidos durante el muestreo, reveló una diversidad genética muy limitada, con el 92% de los mismos mostrando el genotipo ST-5 mediante MLST, el cual es el más prevalente y el que se encuentra más diseminado por los países del sur de Europa (McAuliffe y cols., 2011; Ariza-Miguel y cols., 2013). Esta escasa diversidad genética observada en los aislados de oveja ha sido confirmada en otro estudio llevado a cabo por De Garnica y cols. (2013) en 13 aislados de *M. agalactiae* obtenidos de 45 muestras de leche de granjas de Castilla y León. Sin embargo, estos resultados contrastan de nuevo con los obtenidos en aislados de ganado caprino españoles, en los que un estudio detectó una diversidad genética elevada, a pesar de que habían sido obtenidos de un área geográfica muy restringida, la provincia de Murcia (De la Fe y cols., 2012). En conjunto, estos dos hechos sugieren que la epidemiología de la AC en el ganado ovino y caprino es diferente, al menos en España. Esta situación podría venir motivada: i) por la separación física que existe entre ambos tipos de explotaciones en nuestro país, donde no es común la existencia de granjas mixtas en

régimen de explotación intensivo, lo que dificultaría la entrada del resto de especies de *Mycoplasma* en las explotaciones de ganado ovino; ii) por la existencia de un cierto tropismo de las diferentes especies del patógeno por el hospedador particular. La primera hipótesis podría explicar a su vez la mayor diversidad genética observada en los aislados de cabras españolas, y que podría ser debida al intercambio genético entre las diferentes especies del género *Mycoplasma* que se han detectado en estos rebaños, pero no en los de ovino, ya que se ha demostrado un elevado grado de transferencia genética horizontal (aproximadamente el 18% de su genoma), entre *M. agalactiae* y miembros del grupo *mycoides* (Sirand-Pugnet y cols., 2007).

Desafortunadamente, a pesar de las importantes pérdidas económicas y de la producción láctea que causan estos patógenos en todo el mundo, apenas existen investigaciones a nivel internacional que permitan contrastar esta hipótesis. Mientras que la situación de la AC en el ganado ovino en Francia parece ser similar a la de Castilla y León, con el mismo genotipo de *M. agalactiae* siendo responsable de la AC ovina endémica que ha sido observada durante los últimos 30 años en la región occidental del Pirineo francés (Nouvel y cols., 2012), en Jordania se ha observado una elevada prevalencia de *M. agalactiae* y *M. mycoides* subsp. *capri*, tanto en ovejas como en cabras (Al-Momani y cols., 2008, 2011). Sería muy interesante estudiar estos aislados en ambos tipos de ganado, con el fin de evaluar si su diversidad genética es similar en ovejas y cabras, lo que apuntaría a la hipótesis del intercambio genético, o si por el contrario también es mayor en los aislados de cabras, lo que apuntaría a un tropismo de las especies de *Mycoplasma* por el hospedador.

En cuanto a la metodología aplicada para llevar a cabo la caracterización genómica de los aislados, resulta interesante resaltar que la PFGE proporcionó la mayor capacidad de discriminación, siendo capaz de diferenciar aislados que resultaron genéticamente idénticos mediante MLVA o MLST (Ariza-Miguel y cols., 2013), por lo que se recomienda su uso preferente en los estudios futuros de epidemiología local. Sin embargo, y como se destaca en la introducción, hay que tener en cuenta que estas técnicas miden la diversidad genética en dianas moleculares que poseen un reloj evolutivo distinto, lo que hace que tanto la PFGE como el MLVA sean más apropiados para estudios llevados a cabo en un marco geográfico y temporal relativamente estrecho, ya que de otra manera son susceptibles de sufrir homoplasia y las relaciones filogenéticas observadas podrían venir dadas por fenómenos de evolución convergente, es decir por el azar, mientras que el MLST

es más apropiado para estudios poblacionales, que se llevan a cabo con aislados de orígenes geográficos muy diversos y en un marco temporal más amplio.

En el caso de *S. aureus*, se estima que es responsable de aproximadamente el 80% de las mastitis en ovejas de ordeño, y del 40% de los casos en corderos lactantes, lo que pone de manifiesto la gran importancia de este patógeno para la seguridad alimentaria y para la economía del sector ovino lechero (Mørk y cols., 2007; Koop y cols., 2010; Mavrogianni y cols., 2011). En nuestro trabajo, su prevalencia alcanzó el 68,5% de las explotaciones muestreadas durante los años 2008 y 2009. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, donde el patógeno también ha sido detectado con una prevalencia elevada. En un trabajo realizado en Dakota (Estados Unidos), el 40,6% de las ovejas fueron positivas a la presencia de *S. aureus* (Buyukcangaz y cols., 2013), mientras que en dos explotaciones y un matadero de ovino en Túnez, su prevalencia fue del 41,7% de los animales, a pesar de que estos no mostraban signos clínicos (Gharsa y cols., 2012).

En resumen, nuestros estudios demuestran que *M. agalactiae* y *S. aureus* están ampliamente distribuidos en las explotaciones de ganado ovino de aptitud láctea de Castilla y León, mostrando una prevalencia elevada. A pesar de que en España este hecho no constituye un problema grave para la seguridad alimentaria, como ocurre en países en vías de desarrollo, están causando pérdidas económicas muy importantes para el sector. De hecho, también hay que tener en consideración el carácter colonizador de *M. agalactiae*, que además de implicarse como agente etiológico primario en la AC, facilita la implantación de otros patógenos secundarios, lo que agrava la pérdidas causadas por este microorganismo (Macun y cols., 2010). En el caso de la AC, resulta evidente que a pesar de los continuos esfuerzos que se están llevando a cabo por parte de los ganaderos, las Asociaciones de Defensa Sanitaria y la Administración, al menos desde principios de los 70 (Talegón-Heras, 1974), las estrategias de prevención y control no están siendo efectivas. En consecuencia, estas deberían de ir dirigidas hacia el establecimiento y puesta en marcha de una red de vigilancia epidemiológica de los patógenos en cuestión, con el fin de evitar la dispersión de los mismos, así como la entrada de las otras tres especies de micoplasmas involucradas en el síndrome en las explotaciones de ganado ovino de nuestra Comunidad. Además, debería de pasar a ser obligatoria la participación en el programa para la obtención de calificaciones sanitarias para la AC, que aparece en las disposiciones de la Consejería de Agricultura y Ganadería de Castilla y León (BOCYL, núm. 56, 22 de marzo de 2011, págs. 20062-20064), con el fin de conocer en todo momento la situación de las

explotaciones. También es aconsejable que la monitorización de los patógenos sea llevada a cabo no solo en muestras de leche, sino además en otras muestras biológicas (exudados articulares, sangre, semen, orina, y/o secreción auricular, nasal, ocular o vaginal), dado el alto nivel de excreción intermitente que se ha constatado en nuestro estudio. Por otra parte, las buenas prácticas de manejo durante el ordeño, y la desinfección rutinaria de las herramientas son claves para prevenir la aparición de infecciones mamarias causadas tanto por *Mycoplasma* spp. como por *S. aureus*. Otras medidas importantes para el control de la AC incluyen: i) la investigación sistemática de las lesiones mamarias; ii) evitar el contacto con otros rebaños, ya sea por el uso de pastos compartidos o durante la trashumancia; iii) tomar precaución extrema en la reposición de animales, ya que es uno de los puntos críticos para la entrada de los patógenos a los rebaños; iv) poner en aislamiento a los animales que induzcan la más mínima sospecha de padecer la enfermedad hasta la confirmación del laboratorio, en cuyo caso se recomienda el sacrificio y la desinfección de las zonas que han sido ocupadas por el animal; v) y seguir las recomendaciones de la OIE para la importación de animales desde zonas endémicas.

Por otro lado, la inmunización de los rebaños mediante el uso de vacunas contra la AC es un tema controvertido (Bergonier y cols., 1997), y debe de ser valorado en cada caso por el veterinario responsable de la explotación. Mientras que en algunos estudios se ha descrito su eficacia (López C, 1952; Greco y cols., 2002), en otros casos se ha observado que no impiden la infección, sino que solamente reducen la gravedad de los signos clínicos de la enfermedad, o como mucho limitan la difusión del patógeno (Erdag, 1989; León-Vizcaino y cols., 1995; Tola y cols., 1999; DVM Fernando Martínez, comunicación personal). Además, hay que tener en cuenta que su administración impide el uso posterior de los métodos serológicos para llevar a cabo la monitorización del rebaño, por lo que es aconsejable dejar a un pequeño grupo de individuos sin vacunar con el fin de utilizarlos para dicho menester.

Además de la disminución de la producción láctea, y las pérdidas económicas asociadas para el sector ganadero, la coexistencia de ambas especies bacterianas en las explotaciones puede tener implicaciones importantes en el diagnóstico de los animales infectados y, consecuentemente, en el tratamiento aplicado a los mismos. El diagnóstico erróneo de los animales puede llevar a la administración incorrecta de antimicrobianos, con la consiguiente persistencia de la enfermedad, y con el aumento de la resistencia a los antibióticos, que a su vez, a día de hoy constituye una de las mayores preocupaciones para

la Salud Pública, siendo uno de los tres puntos prioritarios de actuación dentro de la estrategia *One Health*.

La aplicación de la estrategia *One Health* al estudio de la transmisión zoonótica de patógenos con **resistencia a antimicrobianos** es esencial, ya que se trata de un problema extremadamente complejo que involucra a muchas disciplinas y profesionales, como ganaderos, veterinarios, expertos de la industria alimentaria y en la inocuidad de los alimentos, médicos, y un largo etcétera, y la implantación de estrategias de control eficientes implica a todas las partes, desde la granja al hospital, de forma similar a que la inocuidad alimentaria lo hace desde la granja a la mesa. Los antimicrobianos han sido utilizados, y lo seguirán siendo, en el tratamiento y prevención de las infecciones, tanto en Salud Pública como en ganadería o producción vegetal. Su uso en los animales de consumo, junto con la automatización de procesos en los sistemas productivos, y la mejora en el manejo y la alimentación de los animales, ha posibilitado el crecimiento de la ganadería intensiva desde los años 60, permitiendo una mayor densidad de animales y mayor producción, pero a costa de importantes repercusiones en la Salud Pública. En la actualidad, se estima que el consumo de antibióticos a nivel mundial es el doble en animales que en humanos (Aarestrup, 2012). En los Estados Unidos, de las 17.200 toneladas de antibióticos que se utilizan anualmente, el 79% son usados en el ganado, y tan solo el 19% en Salud Pública (Nicogolian, 2015). Aunque estos datos puedan resultar sorprendentes, hay que tener en cuenta que el número de animales productores de alimentos y su tasa de reposición son muy superiores a las del hombre, así como las diferencias fisiológicas entre humanos y animales, por lo que hay que tomar con cautela y perspectiva cualquier intento de comparación directa en el uso de antibióticos en medicina humana y animal (FDA, 2015). Además, no todos los antibióticos utilizados en los animales de producción tienen relevancia para la medicina humana, aunque sí una parte importante de ellos. De las 27 clases de antimicrobianos que se utilizan en los animales, nueve son de uso exclusivo, y las demás de uso compartido (Page y Gautier, 2012). En el caso de los Estados Unidos, la venta y distribución de antimicrobianos para uso terapéutico y sin importancia médica en el año 2012 representó el 39% de las ventas domésticas de todos los antibióticos aprobados para su uso en los animales de producción, siendo el 80% ionóforos. Sin embargo, hay que tomar estos valores con cautela, ya que se desconocen por acuerdos de confidencialidad los datos de los antibióticos de uso exclusivo como promotores de crecimiento, o compartido con el uso terapéutico, y que representan el 69% del total (FDA, 2015). Aun así, los valores mostrados resultan esclarecedores de la

importancia que tiene la regulación de su uso en todos los ámbitos.

En los países industrializados el uso de antimicrobianos está sometido a restricción, diagnóstico previo y probada eficacia (antibiograma). El uso más controvertido, prohibido en la UE desde enero del 2006, es como promotores del crecimiento en los animales de consumo en dosis subterapéuticas (EU, 2003. Regulation No. 1831/2003). En otros países pertenecientes a la OCDE su uso aun está permitido, aunque bajo requerimientos de prescripción que varían dependiendo del país (OCDE, 2015. Tabla 1). Por ejemplo, en los Estados Unidos, la FDA ha publicado recientemente unas directrices de carácter voluntario para la retirada de la industria del uso de los antibióticos de importancia en medicina humana como promotores del crecimiento, y su utilización se da bajo la supervisión de veterinarios con licencia (US Food and Drug Administration, 2013). Sin embargo, la situación en los países en vías de desarrollo es otra muy distinta. Los antibióticos como promotores del crecimiento no están prohibidos en la mayoría de los países que no pertenecen a la OCDE, entre los que además se encuentran los mayores productores mundiales de carne, como Argentina, Brasil, China, Filipinas, India, Indonesia, Rusia y Sudáfrica. En estos países, el uso de antimicrobianos es indiscriminado, no está regulado y no se registra, lo que impide conocer con exactitud cuales, cuantos y para qué se utilizan, así como su potencial impacto en la Salud Pública. Además, el aumento sin precedente en la demanda de proteínas de origen animal desde los países en vías de desarrollo (Tilman y cols., 2011), va a agravar el problema a medio y largo plazo, ya que estos países son los que mayoritariamente van a soportar su producción. Varios estudios publicados recientemente han estimado que el aumento en la demanda de proteínas de origen animal, supondrá a su vez un incremento del 67% en el uso de antimicrobianos en los animales de producción a nivel mundial, desde las 63.150 toneladas en el 2010, hasta las 105.600 en el año 2030, con puntos calientes como India, donde en las áreas de producción avícola intensiva se esperan incrementos del 312% (OCDE, 2015; Van Boeckel y cols., 2015).

Esta enorme presión selectiva está llevando a la emergencia de microorganismos con resistencias a antibióticos, lo que constituye un problema muy grave de Salud Pública ya que comprometen el tratamiento de las enfermedades a medio y largo plazo. Así, del total de más de 7 millones de muertes anuales que causan las enfermedades infecciosas y parasitarias en el mundo (alrededor del 12% del total), 700.000 fueron debidas a bacterias resistentes a antibióticos en el año 2014, y se estima que esta cifra puede aumentar hasta

los 10 millones de muertes anuales en el año 2050, con unos costes de 100 billones \$ (el PIB de España en el 2014 fue de 1,05 billones de €), en el caso de no tomar medidas contra la emergencia y dispersión de estos microorganismos (O'Neill, 2014). En consecuencia, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la presencia de *S. aureus*, y en especial de SARM, tanto en el ámbito animal, en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León, como en el clínico, en el CAULE (Ariza-Miguel y cols., 2014a, 2014b). Además, a pesar de que la EFSA considera que el riesgo de contraer infecciones por SARM a través de los alimentos de origen animal es bajo, varios estudios han demostrado formalmente la existencia de infecciones de transmisión alimentaria (Kluytmans y cols., 1995; Jones y cols., 2002) y, por tanto, los alimentos no deberían de ser descartados como ruta de transmisión de microorganismos con resistencias a antibióticos. Por otro lado, hoy en día la cadena de suministro de alimentos es global, lo que facilita la diseminación de estos patógenos a través del transporte y comercio internacionales. En consecuencia, en este trabajo doctoral también se han llevado a cabo dos estudios con el fin de evaluar el papel del transporte y comercio internacionales, y más en concreto de la venta e importación ilegal de alimentos de origen animal a la UE desde países extracomunitarios, en la diseminación de SARM (Rodríguez-Lázaro y cols., 2014a; Oniciuc y cols., 2014).

En los estudios llevados a cabo en muestras de Castilla y León, se detectó la presencia de SARM tanto en el entorno clínico como en las explotaciones de ganado ovino. De las 229 explotaciones muestreadas, tres resultaron positivas a la presencia de SARM con el gen *mecA* (1,3%, dos explotaciones localizadas en Palencia y una en Valladolid), y en una se detectó el gen homólogo *mecC* (0,4%, Zamora) (nueve y un aislados, respectivamente, del total de 601 *S. aureus* analizados) (Ariza-Miguel y cols., 2014a). Esta ha sido la primera vez que se detecta la presencia de un aislado *mecC*-SARM en ganado en España, el cual mostró el genotipo asociado al ganado ST130-SARM-XI que, junto con el ST425, son los más prevalentes en Europa (Paterson y cols., 2014a). A pesar de que la existencia de este linaje ha sido descrita recientemente (García-Álvarez y cols., 2011; Shore y cols., 2011), el patógeno ya ha sido detectado al menos en 14 países europeos (Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Eslovenia, España, Finlandia, Francia, Holanda, Noruega, Irlanda, Reino Unido, Suecia, y Suiza), y 15 especies animales, incluyendo de producción, salvajes y de compañía (Paterson y cols., 2014a; Dermota y cols., 2015; Gómez y cols., 2015). En nuestro país, en los dos últimos años se ha descrito su presencia tanto en el ámbito hospitalario, como en animales salvajes y en el medio ambiente (García-Garrote y cols., 2014; Gómez y cols., 2014, 2015; Porrero y cols., 2014; Benito y cols., 2015). Sin embargo, a pesar de que *mecC*-SARM se

encuentra ampliamente distribuido por toda Europa, hasta el momento ha presentado una prevalencia baja, tanto en los estudios que se han llevado a cabo en ganado (Paterson y cols., 2014b), como en los hospitales (García-Garrote y cols., 2014; Paterson y cols., 2014a). Además, la caracterización molecular de estos aislados ha demostrado que poseen una diversidad genética escasa, con la mayoría de ellos perteneciendo al CC130 independientemente de su origen geográfico, o del hospedador del que fueron aislados (Paterson y cols., 2014a). Estos resultados son muy interesantes, ya que a pesar de que este linaje no ha sido descrito hasta el 2011, los estudios han demostrado que ha estado circulando libremente por Europa durante al menos los últimos 35 años, por lo que sería esperable que mostrara una mayor prevalencia y diversidad genética (García-Álvarez y cols., 2011). En cuanto a los aislados *mecA*-SARM, mostraron el genotipo asociado al ganado ST398, el cual se detectó inicialmente en explotaciones de porcino y en las personas expuestas profesionalmente a la cría de cerdos de varios países europeos (Voss y cols., 2005), y posteriormente en otros animales de producción (Witte y cols., 2007; Vanderhaeghen y cols., 2010; Couto y cols., 2012). Dos de los aislados mostraron SCC*mec* de tipo V y el restante de tipo IVa. Como era de esperar, en ninguno de los aislados, *mecA*- o *mecC*-SARM, se detectó la presencia de los genes que codifican para la citotoxina PVL, ya que por el momento esta se encuentra restringida a los linajes comunitarios (Vandenesch y cols., 2003).

La baja prevalencia con la que se encontraron ambos clones, ST130 y ST398, en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León, está en consonancia con los estudios previos realizados a nivel internacional (Paterson y cols., 2014a, 2014b; Pantosti y cols., 2012), con la única excepción de un estudio reciente en el que se ha detectado la presencia de *mecC*-SARM en el 69% de los *S. aureus* aislados en una explotación de ciervo rojo (*Cervus elaphus hispanicus*) del sur de España (Gómez y cols., 2015). Sin embargo, y a pesar de su aparente rareza, ambos linajes tienen una gran relevancia para la Salud Pública, ya que por un lado, se ha demostrado su potencial zoonótico (Verkade y cols., 2012; Camoez y cols., 2013; Harrison y cols., 2013; García-Garrote y cols., 2014; Benito y cols., 2015), y por otro, en los últimos años se ha detectado su emergencia en el ámbito hospitalario (Paterson y cols., 2014a; Larsen y cols., 2015). Además, en el caso de *mecC*-SARM, los métodos de rutina utilizados en los hospitales para el diagnóstico de SARM fallan en su identificación, dado que están basados en la detección del gen *mecA* o de su proteína codificada *pbp2a*, y estas presentan una homología baja con *mecC* y su proteína. Este hecho tiene repercusiones muy importantes, ya que compromete el diagnóstico correcto (falsos negativos) y, por

tanto, el tratamiento adecuado del paciente y además sesga los resultados de prevalencia de SARM observados por los hospitales. Por su parte, los aislados pertenecientes al ST398, siempre se habían encontrado asociados a animales, en alimentos de origen animal, o en las personas expuestas a ellos por su actividad profesional, pero a día 17 de septiembre de 2015, se ha publicado un estudio realizado en Dinamarca, en el que se describe que las cepas pertenecientes a este linaje son, cada vez con más frecuencia, causa de enfermedad en personas que no tienen contacto con el ganado. Además, en este mismo estudio informan de un aumento del 66% en su prevalencia anual desde el año 2004 hasta el 2011 (Larsen y cols., 2015). En conjunto, todos estos datos ponen de manifiesto la gran importancia que están adquiriendo estos dos linajes asociados al ganado en la Salud Pública, y la necesidad de establecer programas de prevención y control para evitar su diseminación.

En cuanto al entorno clínico, aunque se detectó la presencia de los linajes asociados al ganado CC130 y ST398 en las explotaciones de ovino de Castilla y León, no los encontramos entre los aislados de SARM procedentes del CAULE. Este hecho, junto con los resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo a nivel nacional, sugieren que su presencia en el ámbito hospitalario en nuestro país es, por el momento, infrecuente. La tasa de recuperación de SARM en el CAULE en los años 2007 y 2008 fue del 38,7% de todos los *S. aureus* detectados. Los aislados pertenecientes al CC5-SARM-IV fueron los observados con mayor frecuencia: ST5-SARM-IV (33,8%), ST125-SARM-IV (23,5%), ST8-SARM-IV (23,5%) y ST125-SARM-IV/VI (14,7%). El genotipo ST228-SARM-I y dos nuevos ST fueron observados en un aislado (1,5%) (Ariza-Miguel y cols., 2014b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios nacionales, los cuales detectaron una tasa de recuperación del 30%, y el reemplazamiento, tras el año 1995, del clon hospitalario clásico con multi-resistencia ST228-SARM-I, el cual había sido el prevalente en los hospitales españoles, por los clones sin multi-resistencias ST5-SARM-IV y ST125-SARM-IV (Vindel y cols., 2006, 2009; Pérez-Vázquez y cols., 2009). Estos resultados apuntan a la existencia de una población endémica clonal en el entorno hospitalario español. Resulta sorprendente que, a pesar del éxito evolutivo del clon ST125 en España durante los últimos 10 años, éste aparentemente no se haya diseminado a otros países Europeos. De hecho, solo siete de los 5.769 aislados de *S. aureus* de la base de datos de MLST, pertenecen a este genotipo, y además cuatro de ellos son de Tenerife. Los otros tres fueron detectados en Finlandia, Francia y Noruega (saureus.mlst.net). Una cepa representativa de este genotipo ha sido secuenciada por Barrado y cols. (2013), y los estudios futuros nos aportarán nuevos puntos de vista sobre las

características genéticas que han permitido el éxito de este clon en nuestro sistema sanitario.

Como era de esperar, se encontraron más resistencias a antibióticos entre los aislados de los pacientes del CAULE, que en los de las explotaciones de ganado ovino de nuestra Comunidad Autónoma, lo que es coherente con la mayor presión selectiva a la que se ven sometidos en el entorno hospitalario. Entre los aislados de las explotaciones de ovino, el *mecC*-SARM se mostró sensible a los 22 antimicrobianos no β -lactámicos probados. Se ha descrito que, hasta el momento, los aislados pertenecientes a este linaje no han adquirido resistencias a otros antibióticos (Paterson y cols., 2014^a, 2014b), con la excepción de algunos casos aislados en los que se ha detectado resistencia a ciprofloxacina (Cuny y cols., 2011). Este hecho está en consonancia con la baja prevalencia en el entorno clínico, lo que hace que no haya sido sometido de forma intensiva a la presión selectiva de los antibióticos. Por su parte, los aislados ST398 fueron resistentes a tetraciclina, además de a los β -lactámicos, lo que concuerda con un reciente estudio llevado a cabo en el Hospital Universitari de Bellvitge, en el que se describe una correlación entre la emergencia de este linaje y el aumento a la resistencia a tetraciclina (Cameoz y cols., 2013). En cuanto a los aislados de SARM del CAULE entre los años 2007-2008, todos fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico y a ciprofloxacina, además de a los β -lactámicos. El 42,6% fueron resistentes a eritromicina, el 21% a clindamicina, el 15,9% a gentamicina, el 4,4% a rifampicina y el 1,5% a tetraciclina y cotrimoxazol. Resulta de particular interés, que el porcentaje de cepas resistentes a gentamicina aumentó desde el 5,7% en el 2007, hasta el 28,6% en el 2008. Todos ellos fueron sensibles a los antibióticos de la familia de los glucopéptidos que se probaron, en concreto a vancomicina y teicoplanina, lo que es un buen dato debido a la reciente emergencia de este tipo de resistencias (Sakoulas y Moellering, 2008), que suponen un gran problema de Salud Pública al tratarse de la última línea de defensa en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multi-resistentes.

En los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, también se analizó la presencia de *S. aureus* (SASM y SARM) en 195 muestras de alimentos decomisados a pasajeros procedentes de 21 países extracomunitarios en vuelos internacionales del Aeropuerto Internacional de Bilbao, así como 200 muestras de alimentos que se vendían ilegalmente en un mercado gris situado en el sureste de Rumania, en la frontera con la República de Moldavia. El término mercado gris ha sido utilizado para referirse a un

mercado de alimentos donde está permitida la venta de frutas y vegetales, pero no así de productos de origen animal, a pesar de lo cual se comercia con ellos. En el primer caso, 66 muestras resultaron positivas a *S. aureus* (33,9%), de las que seis fueron confirmadas como SARM (9,1%) (Rodríguez-Lázaro y cols., 2014a). De las muestras analizadas procedentes del mercado gris, se obtuvieron 32 aislados de *S. aureus* en 16 muestras de alimentos (8%), de las cuales solo uno fue confirmado como SARM (0,5%) (Oniciuc y cols., 2014). Los seis aislados de SARM identificados en las muestras del Aeropuerto de Bilbao, fueron obtenidos de vuelos procedentes de Bolivia. Cinco de ellos pertenecieron al linaje asociado a la comunidad ST8-SARM-IV y fueron positivos a la presencia de la citotoxina PVL, y el restante mostró el genotipo ST1649-SARM-IV y resultó negativo a la presencia de esta citotoxina. En el otro estudio, el aislado SARM perteneció al linaje asociado al ganado ST398-SARM-V, y fue negativo a la presencia de la citotoxina. La detección de estos determinados genotipos en muestras alimentarias de esos orígenes geográficos, está en concordancia con los resultados previamente publicados. Mientras que en la mayoría de los estudios llevados a cabo en alimentos de procedencia europea se ha detectado la presencia del clon asociado al ganado ST398 (De Boer y cols., 2009; Lozano y cols., 2009), parece que su presencia no es común en los alimentos de origen animal producidos en América y, en lugar de ello, es frecuente la detección de clones comunitarios, como el ST8 (Bhargava y cols., 2011). Este hecho indica que en Europa, la presencia de SARM en los alimentos viene mayoritariamente dada por transferencia desde los animales de origen, mientras que en América se da por contaminación durante la manipulación de los alimentos. Estos resultados demuestran que los alimentos de origen animal juegan un papel importante en la diseminación de linajes evolutivamente adaptados, tanto a las poblaciones de animales domésticos productores de alimentos, como a los humanos, y confirman que la importación y venta ilegal de los mismos constituye una ruta para la diseminación de SARM que hasta el momento no ha sido tomada suficientemente en consideración.

Resumiendo la situación de SARM en España, los clones ST5 y ST125 (CC5-SARM-IV) son los prevalentes en el entorno hospitalario de nuestro país y, a pesar de que en nuestros estudios se detectó la presencia de los linajes asociados al ganado *mecC*-SARM y ST398 en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León (Ariza-Miguel y cols., 2014a), así como la introducción en España de aislados comunitarios ST8-SARM-IV a través de la importación ilegal de alimentos en vuelos extracomunitarios (Rodríguez-Lázaro y cols., 2014a), ninguno de estos linajes fueron encontrados en el CAULE (Ariza-Miguel y cols., 2014b). Estos resultados, junto con los obtenidos en estudios llevados a cabo previamente

en el entorno hospitalario español, sugieren que a pesar de la emergencia mundial de estos linajes su presencia es infrecuente en el entorno clínico español, al menos por el momento.

Como se ha descrito en esta memoria sobre los estudios llevados a cabo en SARM, tanto los alimentos de origen animal, como el transporte y comercio internacionales juegan un papel importante en la diseminación de los patógenos. Actualmente, la cadena de suministro de alimentos es global y consumimos de forma rutinaria productos de muchas procedencias, desde el nivel local al internacional, incluso de orígenes exóticos, lo que facilita en gran medida la distribución de los patógenos de transmisión alimentaria por todo el planeta. Este hecho implica que la globalización también tiene un impacto importante en la inocuidad alimentaria, que constituye otro de los grandes problemas globales que necesitan de la aplicación de la estrategia *One Health* para su resolución y prevención.

El concepto de **inocuidad alimentaria** está a su vez interrelacionado con la seguridad alimentaria, hasta el punto de poder considerar que esta es la primera acepción del término en el caso de los países industrializados, e implica que además de existir una disponibilidad de alimentos suficiente, estos tienen que ser seguros en términos de salud. En este sentido, desde la aprobación en el año 2000 del Libro Blanco de Seguridad Alimentaria en la UE, se han venido dictando una serie de directivas y R.D. organizados bajo la denominación de Paquete de Higiene, que configuran una compilación normativa del máximo nivel, cuyo propósito principal es precisamente, garantizar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena. Al igual que el resto de problemáticas globales que se estudian en el marco de la estrategia *One Health*, la inocuidad de los alimentos está afectada por múltiples factores de diversa naturaleza, como la presencia de estos patógenos en los animales de producción, su diseminación mediante el transporte y comercio internacionales, y la salud del medio ambiente, por tanto, las estrategias de prevención y control deben de abarcar a todos los agentes implicados, desde la granja a la mesa.

Las enfermedades de transmisión alimentaria representan un gran problema tanto de Salud Pública, como económico. Se estima que anualmente, hasta el 30% de la población que vive en los países industrializados sufre algún tipo de enfermedad de transmisión alimentaria (Velusamy y cols., 2010). Solo en los Estados Unidos, los 31 principales patógenos alimentarios fueron responsables de 9,4 millones de infecciones, 55.961 hospitalizaciones y 1.351 muertes (Scallan y cols., 2011), con unos costes estimados

de entre 14.000 y 152.000 millones \$ anuales (Scharff, 2010, 2012; Hoffmann y cols., 2012). En Europa, el último informe de la EFSA ha informado de 5.196 brotes alimentarios en 2013, afectando a más de 314.000 individuos.

De todas las enfermedades zoonóticas investigadas por la UE, la listeriosis fue responsable de los casos más graves, con una tasas de hospitalización y mortalidad del 99,1% y 15,6%, respectivamente. Además, se observó por quinto año consecutivo una tendencia en el aumento de los casos en la UE-28, con un incremento del 9,4% en el 2013 con respecto al año anterior (EFSA, 2015). Sin embargo, es importante señalar que *L. monocytogenes* es poco virulento, ya que actúa como patógeno oportunista, produciendo enfermedad en individuos previamente inmunocomprometidos. En España, la listeriosis no ha sido incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria hasta el año 2015 (BOE, núm. 65, 17 de marzo de 2015, págs. 24012-24015) por lo que existe poca información epidemiológica disponible sobre los linajes de *L. monocytogenes* que están circulando en nuestro país. Además, en los últimos años se ha observado la existencia de unos pocos clones prevalentes con distribución mundial (Chenal-Francisque y cols., 2011), lo que sugiere que el transporte y comercio internacional de alimentos podría estar jugando un papel importante en su diseminación. Consecuentemente, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha investigado la presencia de este patógeno en España, tanto en el ambiente clínico (CAULE), como en alimentos de origen animal decomisados a pasajeros de vuelos procedentes de países extracomunitarios (Aeropuerto Internacional de Bilbao), con el objetivo de conocer las características fenotípicas y genotípicas de los aislados que están circulando en el entorno clínico en Castilla y León, y de los que están siendo introducidos en nuestro país a través de una ruta potencial de diseminación que no había sido estudiada hasta ese momento.

Se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en 20 de las 200 muestras de alimentos decomisados en el Aeropuerto de Bilbao (10%). Entre ellas, la prevalencia fue del 12,9%, 9,5% y 6,8%, en productos cárnicos, avícolas y queso, respectivamente, valores que están significativamente por encima de los recogidos por la EFSA en los países miembro de la UE-28. De acuerdo con su último informe, se detectó por encima de los límites legales (>100 ufc/g) en productos listos para el consumo en el punto de venta final, con una prevalencia de 0,5%, 0,3% y 0,2% en las muestras individuales de productos pesqueros, quesos blandos y semi-blandos y cárnicos, respectivamente (EFSA, 2015).

Nuestros estudios revelaron una diversidad genética elevada en los aislados de *L. monocytogenes*, obtenidos tanto de las muestras hospitalarias, como de las de alimentos. Los aislados clínicos del CAULE mostraron los genotipos ST1 (23,5%), ST16 (17,6%) y ST3 (11,8%). También se observó un aislado (5,9%) de los genotipos ST2, ST4, ST7, ST8, ST9, ST87, ST389 y ST399 (Ariza-Miguel y cols., 2015). Por otro lado, los aislados recuperados de las muestras de alimentos confiscadas en el Aeropuerto Internacional de Bilbao, mostraron los genotipos ST2 (40%), ST9 (15%), ST8 (10%) y ST87(10%). El ST37, ST155, ST199, ST308 y ST378 se detectaron en un solo aislado (5%) (Rodríguez-Lázaro y cols., 2014b). Esta es la segunda vez que se detectan aislados del genotipo ST87 relacionados con enfermedad en España. Pérez-Trallero y cols. (2014) han descrito recientemente la existencia de dos brotes de listeriosis en humanos causados por cepas pertenecientes a este genotipo en Guipúzcoa, por lo que nuestro estudio demuestra que el ST87 había estado circulando con anterioridad en el entorno clínico español. En consecuencia, sería recomendable monitorizar la diseminación de los aislados pertenecientes a este genotipo con el fin de detectar rápidamente su emergencia potencial en los hospitales de nuestro país.

Otro resultado destacable, es que varios aislados provenientes de orígenes geográficos muy distantes mostraron el mismo genotipo. De esta manera, se detectaron aislados pertenecientes al ST2 en muestras de alimentos de Argentina, Ecuador, Georgia, Perú y Ucrania; del ST87 en muestras de Colombia y Venezuela; y del ST9 en muestras de Bolivia, China y Turquía. Además, los aislados de los genotipos ST2 y ST87 (linaje I), y ST8 y ST9 (linaje II), fueron observados tanto en los pacientes del CAULE, en un área geográfica muy restringida del noroeste de España, como en las muestras de alimentos de Argentina, Bolivia, China, Colombia, Ecuador, Georgia, Perú, Turquía, Ucrania y Venezuela (Rodríguez-Lázaro y cols., 2014b; Ariza-Miguel y cols., 2015). Estos datos concuerdan con lo descrito en la bibliografía, que indica la existencia de unos pocos clones prevalentes con distribución mundial (Chenal-Francisque y cols., 2011). Este hecho también se ve avalado por los resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos que obtuvimos para ambos tipos de muestras, ya que se encontró resistencia a los mismos antibióticos: clindamicina (100% de los aislados clínicos y 82,4% de los alimentarios), daptomicina (95% y 17,6% de aislados clínicos y de alimentos, respectivamente) y ciprofloxacina (5% vs 5,9%). Resulta interesante que todos los aislados, tanto clínicos como de alimentos, que mostraron resistencia a tetraciclina y/o ciprofloxacina pertenecieron al linaje II (serotipo 1/2a; 3a), y además se observó un aumento en la resistencia a daptomicina y ciprofloxacina en los aislados

clínicos de los años 2013 y 2014, datos a tener en cuenta de cara al tratamiento futuro de los pacientes con listeriosis en el CAULE.

Varios estudios han observado que, mientras que los aislados pertenecientes al linaje I (en particular los serotipos 1/2b y 4b) son detectados con mayor frecuencia en casos de listeriosis humana, los del linaje II (en especial el serotipo 1/2a), normalmente son recuperados de alimentos, ambientes relacionados con los mismos y están asociados a casos de listeriosis en animales (Orsi y cols., 2011). Por tanto, se ha propuesto la hipótesis de que las cepas del linaje I son más virulentas que las del linaje II, llevando a una sobrerrepresentación del primero entre los casos clínicos humanos. Sin embargo, entre los aislados de *L. monocytogenes* estudiados, observamos porcentajes similares de cepas pertenecientes a ambos linajes, sin tener en cuenta su origen: 55% de aislados del linaje I y 45% del II en las muestras alimentarias, vs 58,8% y 41,2% en las muestras clínicas. Pero por otro lado, resulta interesante que los dos casos de listeriosis del CAULE que cursaron con la muerte del paciente, fueron causados por aislados del linaje I (casos clínicos 4 y 9, ST 1 y 389, serovar 4b), y además, el aislado del caso clínico nº 9, mostró la mayor capacidad de invasión *in vitro* de los 17 aislados estudiados (más de 3 veces superior a la mostrada por la cepa salvaje P14). Por tanto, las discrepancias observadas podrían deberse a la baja representatividad del número de cepas analizadas provenientes del CAULE.

Los estudios de epidemiología molecular de todos los aislados de *L. monocytogenes* que causaron infecciones invasivas en el CAULE durante el periodo 2006-2014, revelaron la existencia de un brote de listeriosis que no había sido detectado hasta el momento. El brote afectó a tres pacientes, residentes en tres municipios cercanos, y tuvo lugar en octubre de 2009 (pulsotipo D, casos clínicos 8, 9 y 10). En los últimos años se han realizado varios estudios de epidemiología molecular de aislados obtenidos en brotes de listeriosis (Jackson y cols., 2011; Pérez-Trallero y cols., 2014; Okpo y cols., 2015), demostrando su gran utilidad en la identificación de su origen, para así poder atajarlos cuanto antes y limitar su impacto.

En resumen, demostramos que los mismos clones prevalentes están circulando en un hospital regional de una zona muy restringida de Castilla y León, y en alimentos decomisados de pasajeros provenientes de países extracomunitarios de orígenes muy diversos, lo que avala la existencia previamente descrita de unos pocos clones prevalentes con distribución mundial. Estos resultados, al igual que los observados en los aislados de SARM obtenidos de alimentos decomisados en este mismo tipo de vuelos comerciales,

confirman que la importación ilegal de alimentos de origen animal está jugando un papel importante en la prevalencia y diseminación de los clones epidémicos, por lo que es necesario el establecimiento de programas de vigilancia que limiten su dispersión, y nos permitan conocer la evolución en su prevalencia y características genéticas. De hecho, esta ruta de diseminación de patógenos podría tener un papel más relevante del que en principio se podría pensar, dada la magnitud que ha adquirido el transporte internacional en los últimos años, con un equivalente a la mitad de la población mundial viajando en vuelos comerciales en el 2013 (data.worldbank.org). Además, los estudios de epidemiología molecular de los aislados del CAULE, revelaron la existencia de un brote de listeriosis que no había sido identificado hasta el momento. La implantación de este tipo de investigaciones de forma rutinaria permitiría la identificación de los brotes de listeriosis, y de su origen, limitando el número de individuos afectados.

El último patógeno estudiado en esta Tesis Doctoral, *F. tularensis*, se engloba en el marco de la estrategia *One Health*, dentro de las zoonosis, como **riesgo biológico** (Figuras 2, 3, 5). La tularemia constituye el ejemplo perfecto de que la salud del hombre, los animales y el medio ambiente están interconectadas, y que para comprender mejor y responder con rapidez a las enfermedades zoonóticas en la interfaz entre el hombre-animal-medio ambiente, se requiere de un enfoque holístico, transdisciplinar, intersectorial, colaborativo y coordinado, que es todo lo que representa y justifica la estrategia *One Health*. Los patógenos que constituyen un riesgo biológico, tienen repercusiones importantes no solo en la Salud Pública, sino también en la economía y el estado del bienestar de individuos, comunidades y naciones. Los últimos datos publicados por la OMS y *The World Bank* estiman que las enfermedades infecciosas y parasitarias fueron responsables del 12,6% y 11,6% de las muertes mundiales en el 2011 y 2012, respectivamente (más de 7 millones de muertes anuales) (www.who.int).

F. tularensis, es uno de los seis patógenos de Clase 1 listados por el *Department of Health and Human Services* de los Estados Unidos, por su potencial para causar efectos adversos en la Salud Pública, y bajas masivas en ataques bioterroristas (www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-10-05/html/2012-24389.htm). Las características de este patógeno le hacen idóneo como agente de bioterrorismo: i) su elevada contagiosidad, que hace que la tularemia pueda ser adquirida a través de dosis infecciosas muy bajas de 10 a 50 bacterias, por inhalación, contacto directo con animales infectados, o ingestión de agua o alimentos contaminados (Foley y Nieto., 2010); ii) el gran número de especies

susceptibles que pueden actuar como hospedadores, reservorios o vectores de la enfermedad (Hopla y Hopla, 1994; Keim y Wagner, 2009); iii) y su capacidad de persistencia en el medio ambiente a pesar de no formar estructuras de resistencia (Berrada y Telford, 2009). De hecho, *F. tularensis*, junto a los agentes etiológicos del ántrax, la brucelosis y el botulismo, fueron objeto de interés del Reino Unido ya durante la Segunda Guerra Mundial, bajo el gobierno de Winston Churchill, durante la cual se investigó su uso como arma biológica (Prasad, 2009). Más tarde, durante la Guerra Fría (1947-1991), los Estados Unidos, el Reino Unido y la antigua Unión Soviética, continuaron con las investigaciones. El uso de las armas biológicas y químicas fue ilegalizado en el Protocolo de Ginebra de 1925, y después, en la Convención de Armas Biológicas en 1972, donde además se prohibió su desarrollo, producción y almacenamiento. Desde entonces, los gobiernos han reorientado sus políticas hacia la investigación para el desarrollo de programas de biodefensa, con el fin de prevenir ataques biológicos que podrían producir un número incontable de daños colaterales, el pánico de la población y socavar gravemente el estado de bienestar.

Como se describe en la introducción, en Castilla y León este patógeno tiene una gran relevancia, ya que fue el agente causal de dos brotes de tularemia en humanos que afectaron a más de 1.000 personas (De Mateo y cols., 1998; Martín y cols., 2007; Allue y cols., 2008). En consecuencia, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral llevamos a cabo un estudio de epidemiología molecular desde la aproximación *One Health*, caracterizando 30 aislados humanos (8 y 22 de los brotes de 1997 y 2007, respectivamente) y 68 aislados animales (29 y 39 de 1997 y 2007), con el fin de conocer las posibles causas de la reemergencia de la enfermedad tras 10 años de silencio epidemiológico. Las investigaciones se llevaron a cabo a través de la colaboración interdisciplinar entre nuestro instituto, el ITACyL, y la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, el LRSA, el CAULE y el Hospital de Valladolid.

Los resultados que obtuvimos en la caracterización bioquímica de los aislados de *F. tularensis* de ambos brotes en Castilla y León, concordaron con los publicados previamente por Del Blanco y cols. (2004) en 42 cepas recuperadas en el primer brote de 1997. De esta manera, todos los aislados mostraron una actividad catalasa débil y oxidasa negativa, produjeron ácido en un medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono, pero no fueron capaces de fermentar glicerol, y finalmente, ninguno de los aislados fue capaz de hidrolizar urea.

Como era de esperar, todos los aislados de *Francisella* spp. de Castilla y León pertenecieron a la subsp. *holarctica*, ya que la presencia de la subsp. *tularensis* en Europa tan solo se ha descrito en una ocasión (Gurycová, 1998). La caracterización genética de los aislados mostró una diversidad genética muy limitada, independientemente del hospedador, el origen geográfico, o el brote del que fueron recuperados (Ariza-Miguel y cols., 2014c). Este resultado está en concordancia con los publicados previamente a nivel mundial (Johansson y cols., 2004; Farlow y cols., 2005; Vogler y cols., 2009; Gyuranecz y cols., 2012), incluyendo los observados tras la caracterización genética mediante PFGE, AFLP y secuenciación del ARN 16s, de 44 aislados provenientes del primer brote en Castilla y León (Blanco y cols., 2002), por lo que se ha formulado la hipótesis de la existencia de un cuello de botella reciente, o un evento de expansión de los clones más adaptados evolutivamente, que redujo de forma drástica la variabilidad genética de esta población bacteriana (Johansson y cols., 2004; Vogler y cols., 2009). Además, todos los aislados españoles mostraron la delección de 16 pb en el marcador FT-M24, y de 1,59 kpb en el *loci* RD23, que son marcadores genéticos del subclado B.FTNTF002-00, y que fueron descritos por primera vez en 42 aislados procedentes de los brotes de tularemia en Castilla y León y el Sur de Francia, en 1997 y 1999, respectivamente (Dempsey y cols., 2007). Este grupo genético está ampliamente distribuido en los países de Europa central y del oeste, incluyendo Alemania, España, Francia, Italia y Suiza, y por tanto ha sido designado como el grupo de Europa Occidental (Dempsey y cols., 2007; Pilo y cols., 2009; Svensson y cols., 2009a; Vogler y cols., 2009, 2011; Chanturia y cols., 2011; Gyuranecz y cols., 2012; Gehringer y cols., 2013; Müller y cols., 2013). Resulta interesante que en Suiza, hasta el 2012, solo se habían detectado cepas del grupo B.FTNTF002-00, pero a partir de este año se ha informado de la emergencia de aislados pertenecientes al grupo filogenético B.13 (Origgi y cols., 2014), los cuales son predominantemente detectados en los países de Europa Oriental incluyendo Eslovaquia, Finlandia, Georgia, Republica Checa, Rusia y Ucrania (Gyuranecz y cols., 2012). Este descubrimiento tiene relevancia clínica, ya que los aislados pertenecientes al grupo B.13 son resistentes a eritromicina, en contraste con las cepas del grupo B.FTNTF002-00. Por tanto, sería interesante investigar si las cepas pertenecientes a este grupo también están penetrando en nuestro país, con el fin de alertar a las autoridades sanitarias sobre la emergencia potencial de aislados de *F. tularensis* con resistencia a eritromicina. Además, los resultados obtenidos apuntan a que la forma clínica de la enfermedad viene determinada por los procesos ecológicos involucrados en la infección (*i.e.* ruta de infección y dosis infectiva), en lugar de por el genotipo del patógeno, ya que

pacientes que estaban infectados por el mismo genotipo, mostraron una forma clínica de la enfermedad diferente.

En cuanto a la metodología utilizada para realizar la caracterización genómica de los 98 aislados recuperados en el conjunto de los dos brotes, el MLVA de 16 *loci* con diversidad genética alta proporcionó mayor discriminación que la PFGE con dos enzimas de restricción, definiéndose ocho genotipos con la primera técnica y tres pulsotipos con la segunda. En cualquier caso, y como se describe en el párrafo anterior, la escasa diversidad genética de *F. tularensis*, y en especial de la subsp. *holarctica*, ha sido demostrada en numerosos estudios internacionales (Johansson y cols., 2004; Vogler y cols., 2009; Farlow y cols., 2005; Gyuranecz y cols., 2012), y supone un gran obstáculo a la hora de determinar correlaciones entre genotipo y hospedador. En próximos estudios, la utilización de nuevos sistemas de genotipado con mayor poder de discriminación, entre los que se incluyen los polimorfismos de nucleótido único canónicos (canSNPs) (Vogler y cols., 2009), inserciones/delecciones (INDEL) (Svensson y cols., 2009) o la secuenciación del genoma completo (WGS) (Birdsell y cols., 2014), quizás ayuden a determinar que genotipos están más frecuentemente asociados a enfermedad en los distintos hospedadores, y por tanto a definir las principales especies animales que están involucradas en la transmisión de la enfermedad.

Otro de los resultados más relevantes de nuestra investigación, es que se encontraron los mismos genotipos del patógeno circulando por todos los hospedadores, humanos y animales, independientemente del brote del que fueron aislados. Este dato tiene una importancia especial, ya que, como se describía en la introducción, ambos brotes se dieron en contextos epidemiológicos diferentes (De Mateo y cols., 1998; Allue y cols., 2008), lo que apunta a que tanto las liebres (*Lepus spp.*), como el topillo campesino (*Microtus arvalis*), juegan un papel en la transmisión zoonótica de la enfermedad en Castilla y León. Por otro lado, este hecho nos impide conocer cuál de las dos especies animales está jugando un papel más importante como fuente de infección en la transmisión de la enfermedad, desconociéndose pese a todo la naturaleza del reservorio fundamental. No obstante, datos procedentes del Plan de Vigilancia de la fauna silvestre, puesto en práctica por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, apuntan a una importancia mayor en términos relativos de las liebres, que a partir de los diagnósticos efectuados en el LRSA, alcanzaron valores del 22% de positivos a la presencia del patógeno en el brote de 2007-2008 (sobre más de 300 muestras), en tanto que el porcentaje de

topillos positivos se situó por debajo del 2% (sobre un total de 650 muestras), con casos esporádicos en otras especies (conejos de monte y otros roedores) (Servicio de Sanidad Animal. DGPAP. Comunicación personal).

En un estudio publicado recientemente por Luque-Larena y cols. (2015), se describe una correlación entre los casos de tularemia en humanos y la abundancia de topillos en la "Tierra de Campos", lo que según los autores, sugiere que este roedor puede estar actuando como agente de contagio durante los brotes de tularemia en esta área geográfica. Sin embargo, este estudio sigue una aproximación demasiado simplista. En primer lugar, se dice que el brote de tularemia en humanos de 1997 también coincidió en el tiempo con un pico en la población del topillo campesino en la región, como se documentó en el brote del 2007. Sin embargo, todos los pacientes mostraron antecedentes de haber manipulado liebres procedentes de la caza, y más del 70% de los mismos mostraron las formas clínicas ulceroglandular y glandular, que son compatibles con la adquisición mediante el contacto directo con los animales infectados (Boletín Epidemiológico Semanal, 1997; De Mateo y cols., 1998). Si una gran población de topillos hubiera actuado en la amplificación del brote, sería esperable que el número de casos que mostraran las formas clínicas neumónica y tifoidea hubiese sido mayor, sin embargo, solo el 6,6% de los pacientes las mostraron, lo que parece indicar que en el brote de tularemia de 1997 los topillos no jugaron un papel relevante. En segundo lugar, la metodología utilizada para llevar a cabo las correlaciones introduce un sesgo importante en la investigación, ya que los datos de abundancia de topillos en Segovia durante el periodo 1997-2007 (Fargallo y cols., 2009), fueron comparados a los casos de tularemia en humanos en toda la "Tierra de Campos", alegando que estos datos "están en sincronía" con los brotes en la población de topillos de Castilla y León (Luque-Larena y cols., 2013), cuando Segovia ni siquiera pertenece a comarca natural de Tierra de Campos, que se extiende por las provincias de Palencia, Valladolid, Zamora y León. Además, de los más de 1.000 casos confirmados de tularemia en humanos en el conjunto de los dos brotes, ninguno tuvo lugar en la provincia de Segovia (Boletín Epidemiológico Semanal, 1997; Rodríguez-Ferri, 2007). Por último, solo se correlaciona la abundancia de uno de los muchos hospedadores, reservorios y vectores potenciales, el topillo, con los casos de tularemia en humanos, sin tener en cuenta los otros muchos factores, bióticos y abióticos, involucrados. Con todo lo expuesto hasta el momento en esta memoria sobre la necesidad de abordar los problemas desde una aproximación holística, creemos que las conclusiones de este estudio son prematuras, y que se necesitan más investigaciones que evalúen de forma conjunta todos

los potenciales hospedadores, reservorios y vectores animales y ambientales del patógeno, con el fin de identificar de forma más precisa los focos endémicos de la enfermedad en Castilla y León.

En otro estudio previo llevado a cabo por Vidal y cols. (2009), se evaluó la posible interacción entre el uso de rodenticidas y la sensibilidad del topillo campesino (*Microtus arvalis*) a padecer infección mediante *F. tularensis*, durante el brote de tularemia de 2007 en Castilla y León. En los muestreos se recogieron un total de 21 topillos vivos y 31 muertos de seis localizaciones, cinco en la provincia de Palencia y una en Segovia: Baquerín, Castromocho y Lomas como zonas tratadas con el rodenticida (clorofacinona), y Boada, San Pedro Gaillos y Tamara como zonas control sin tratar. En el mismo, se concluye que la muerte de los topillos en las áreas que fueron tratadas con clorofacinona fue causada tanto por el rodenticida en cuestión, como por la infección con *F. tularensis*, ya que el 93% de los topillos encontrados muertos estas zonas presentaban, o bien residuos del rodenticida en el hígado, y/o fueron positivos mediante PCR a la presencia del patógeno. También se concluye que el uso de rodenticidas en el brote del 2007, aumentó el número de topillos muertos en los campos durante el periodo de cosecha, “muchos de los cuales estaban infectados con *F. tularensis*”. Además, informan de una “prevalencia” del 66,7% en los topillos muertos de las zonas tratadas, datos que contrastan ampliamente con los obtenidos a nivel oficial en el Plan de Vigilancia de la fauna silvestre, ya mencionados anteriormente. Como se discute con más detalle a continuación, estas conclusiones se basan en premisas que no poseen el suficiente aval científico.

4 De nuevo, este estudio toma conclusiones prematuras, basadas en un diseño experimental muy limitado, e introduciendo sesgos importantes debido a la metodología empleada. En primer lugar, el estudio se limita a tres muestreos puntuales, uno antes y dos después del tratamiento con el rodenticida, en un marco temporal muy estrecho, entre el 19 de febrero y el 4 de marzo del 2007. Además, el muestreo no se realizó siguiendo un procedimiento aleatorio, sino que las zonas a muestrear fueron seleccionadas a conveniencia, limitándose a seis localizaciones, cinco en la provincia de Palencia y una en Segovia, por lo que los resultados obtenidos en las áreas muestreadas no deben ser extrapolados a toda la zona tratada con el rodenticida, y mucho menos a la totalidad de Castilla y León (Salman, 2003, capítulo 4). Por otro lado, el tamaño de la muestra necesario para obtener valores de prevalencia representativos tampoco fue calculado adecuadamente, seleccionándose de forma ciega, que no aleatoria, 21 topillos vivos de

entre todos los capturados para hacer la estimación de la densidad de la población, y 31 que fueron encontrados muertos durante la realización de los trabajos de campo, tanto de las zonas tratadas con rodenticida como de las no tratadas (28 de zonas tratadas y 3 de zonas no tratadas). Aplicando un muestreo aleatorio adecuado, con una prevalencia estimada desconocida, fijada en el 50% con el fin de asegurar la máxima representatividad del muestreo (Naing y cols., 2006, Figura 1), un nivel de confianza del 95%, y una precisión del 3%, el número de topillos necesario para este tipo de estudio sería de 1.067 individuos, muestreados aleatoriamente del conjunto de la zona afectada por el brote (Salman, 2003; Naing y cols., 2006). Por tanto, tanto el área de estudio, como el número de individuos estudiados son a todas luces insuficientes para que las conclusiones obtenidas puedan ser inferidas a toda la población de topillos de las áreas tratadas con el rodenticida, y mucho menos a toda la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

Por otro lado, la estimación de la densidad de topillos fue calculada en base a los resultados obtenidos en cuatro puntos de muestreo, todos ellos pertenecientes al municipio de Castromocho, y en un solo tipo de cultivo, la alfalfa, cuando tan solo representaba en el 2008 el 2,2% del total de superficie de cultivo de la región afectada por el brote, y el 14,2% con respecto a los cultivos de regadío, el hábitat preferido por el roedor (Boletín de Información Agraria de Castilla y León, 2008; JCYL, superficies de cultivos por provincias, comarcas y municipios 2008). Los campos de alfalfa son uno de los hábitats preferidos por estos roedores, por lo que los valores obtenidos están con toda seguridad sobreestimados, y desde luego no son representativos de la situación global en Castilla y León durante el brote del año 2007. A este hecho hay que sumar que el método de captura mediante trampas no representa al total de la población, ya que implica que los individuos tuvieron que desplazarse hasta allí y entrar en ellas, por lo que esta muestra tan sólo representaría a la parte de la población activa durante el muestreo. Este dato explica porqué ninguno de los topillos capturados vivos en las zonas tratadas mostró residuos del rodenticida, ya que la clorofacinona no es de efecto fulminante, sino que su efecto hemorrágico y anticoagulante evoluciona a lo largo de unos pocos días, durante los cuales el topillo reduce progresivamente su actividad, hasta morir.

Otro punto a tener en consideración, es que en los estudios estadísticos que se llevaron a cabo para investigar la relación entre las hemorragias, y los residuos de clorofacinona, tan solo se tuvieron en cuenta los 31 topillos que se encontraron muertos,

por lo que de nuevo se introduce un sesgo importante debido a la baja representatividad del muestreo.

El resultado más controvertido de estas investigaciones probablemente sea el valor de "prevalencia" de *F. tularensis* observado, que alcanza el 66,7% de los topillos muertos en las zonas tratadas, no solo por el gran contraste que se observa con los datos oficiales, sino por la metodología empleada tanto en la obtención del material genético del patógeno, como en la detección molecular del mismo. La detección de *F. tularensis* en tejidos infectados presenta múltiples dificultades. En primer lugar, para el aislamiento y purificación del material genético, los expertos en estudios de detección del patógeno en roedores recomiendan la homogenización mecánica de 0,5g de bazo e hígado en 0,9ml de PBS, y la posterior lisis de una alícuota de 20µl del homogenizado, mediante la utilización de determinados sistemas de extracción comerciales (QIAamp® DNA Mini Kit o Roche MagNA Pure) (Kaysser y cols., 2008; Dr. Splettstoesser, comunicación personal). A continuación, se necesitan sistemas de detección que sean tanto sensibles como específicos, ya que la mayoría del ADN obtenido va a pertenecer al tejido del hospedador infectado. Tanto la OIE como la OMS recomiendan sistemas que han sido previamente validados (OIE Terrestrial Manual, 2008; WHO guidelines on Tularemia, 2007), tanto uno de PCR convencional, basado en la detección del gen *tu14* (Johansson y cols., 2000), como otro más reciente de PCR a tiempo real que ha probado ser aún más específico, ya que está basado en la detección simultánea de tres genes *ISFtu2*, *23kDa* y *tu14* (Versage y cols., 2003). Sin embargo, en este estudio se utilizan métodos que no han sido validados, tanto para la obtención del material genético, como para la detección molecular del mismo (Long y cols., 1993). En cualquier caso, y dada la relevancia de los valores obtenidos, estos deberían haber sido confirmados mediante otros procedimientos, como el aislamiento directo del patógeno en medios de laboratorio selectivos, que es lo que la OMS especifica para poder hablar de casos confirmados de tularemia, y/o haber llevado a cabo la secuenciación de los fragmentos de 250 pb de ADN amplificados para comprobar la naturaleza de los mismos.

Otro dato interesante que cuestiona el valor de prevalencia obtenido, es la elevada susceptibilidad de los micrótidos a la bacteria. Rossow y cols. (2014) han llevado a cabo recientemente un estudio en dos especies de la familia *Cricetidae*, el topillo agreste (*Microtus agrestis*) y el topillo rojo (*Myodes glareolus*), demostrando que ambas son muy susceptibles al patógeno. Esto indica que de haber sido tal la prevalencia de *F. tularensis* en los topillos durante el brote del 2007, la población de roedores se habría colapsado

rápidamente por la acción del patógeno. Sin embargo, la plaga de topillos se extendió a lo largo del 2007, prolongándose hasta la primavera-verano del 2008, lo que apunta a que la prevalencia de *F. tularensis* entre los topillos no pudo ser tan elevada.

En conjunto, demostramos que los dos brotes de tularemia en humanos que tuvieron lugar en 1997 y 2007, y que estuvieron separados por 10 años de silencio epidemiológico, fueron causados por el mismo grupo de genotipos filogenéticamente relacionados pertenecientes al grupo genético B.FTNF002-00. Este descubrimiento apunta a que la reemergencia de la tularemia en 2007 no fue debida a la introducción de una cepa exótica, sino a la persistencia de reservorios locales de infección por el momento desconocidos. Las estrategias de prevención y control regionales deberían de ir dirigidas hacia el control de las poblaciones de topillos y liebres, ya que parecen ser un factor importante en la transmisión zoonótica de la enfermedad. Además, se deberían de llevar a cabo campañas de concienciación ciudadana para informar a la población que vive en las zonas endémicas, así como a los grupos de riesgo como los cazadores, jardineros, veterinarios, o personas que practican de forma frecuente actividades al aire libre, de los riesgos asociados a la exposición ambiental: no tocar animales muertos, evitar el contacto con los reservorios potenciales y usar insecticidas para evitar la picadura de insectos hematófagos. Además, se necesitan más estudios para determinar de forma precisa la localización de los focos endémicos de la tularemia en nuestra región, así como evaluar el papel de otros reservorios ambientales y animales, como ya hemos señalado.

Como ha quedado patente a lo largo de toda esta memoria, los problemas estudiados son extremadamente complejos, tienen carácter global, transdisciplinar y están influenciados por multitud de factores de diversa naturaleza. En consecuencia, deben de ser abordados desde un enfoque holístico y una perspectiva integradora. La aplicación de la estrategia *One Health* al estudio de patógenos con relevancia en Castilla y León, tanto en el ámbito de la Salud Pública como en la Sanidad Animal, nos ha permitido extraer conclusiones importantes, tanto para conocer la situación actual de los mismos en nuestra Comunidad Autónoma, como para el diseño de estrategias de prevención y control efectivas que permitan evitar la diseminación de los patógenos y limitar su impacto. Estas investigaciones no habrían sido posibles sin la acción coordinada entre instituciones y profesionales de todos los ámbitos implicados, que ha aportado un valor añadido a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Asimismo, y aunque queda fuera del ámbito de aplicación de este trabajo, es importante señalar que la implantación de la estrategia

One Health debe de ser un continuo desde el nivel local hasta el nivel internacional, y que los resultados de las investigaciones tienen que verse reflejados en regulaciones, y no solo en recomendaciones, como ocurre con especial frecuencia en el ámbito internacional. Por último, aunque no menos importante, me gustaría resaltar un hecho que he “sufrido” durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral. Como licenciado en Biología que soy, me he visto lastrado en demasiadas ocasiones por la falta de conocimientos en el ámbito de la medicina, tanto humana como animal. Por tanto, considero que otro pilar fundamental para articular adecuadamente el concepto *One Health* en el futuro, es el desarrollo y aplicación de un currículo específico que integre los aspectos básicos de todas las disciplinas relacionadas.

Capítulo 5

Conclusiones

1. *Mycoplasma agalactiae* y *Staphylococcus aureus* continúan siendo una importante causa potencial de mastitis ovina en Castilla y León, como lo demuestran las elevadas prevalencias encontradas en este estudio (36,8% y 68,5%, respectivamente).
2. En España, la agalaxia contagiosa ovina se presenta con una epidemiología propia, diferenciada de la caprina. Por un lado, *Mycoplasma agalactiae* representa la única especie microbiana implicada en este síndrome, y por otro, manifiesta una elevada homogeneidad genética que confirma la presencia de una población endémica clonal. Otros estudios han evidenciado que en el ganado caprino, además de la implicación de otras tres especies de este género bacteriano, *M. agalactiae* muestra una diversidad genética elevada.
3. La metodología utilizada en este estudio, desde la toma de muestras a su procesado para el aislamiento y/o detección de *Mycoplasma* spp., se reveló suficientemente útil y eficiente, idónea para su utilización en un programa de vigilancia sanitaria de los rebaños.
4. El uso exclusivo de métodos microbiológicos convencionales puede conducir a falsos resultados negativos, debido a los complejos requerimientos nutricionales de los mycoplasmas y a la dificultad que entraña su aislamiento y detección en medios de cultivo, debiéndose complementar con la aplicación de técnicas de detección molecular, más sensibles.
5. La presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) tanto en el entorno clínico humano del Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE), como en las explotaciones de ganado ovino de Castilla y León investigadas, igual que en alimentos de origen animal importados clandestinamente a la Unión Europea (UE), subraya la necesidad de un abordaje integral, holístico, multidisciplinar, para el estudio de la emergencia de microorganismos portadores de resistencias antibióticas, particularmente de SARM, en programas de prevención y control en el marco de la estrategia "One Health".
6. Los clones ST5 y ST125 (CC5-SARM-IV) de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina fueron los más prevalentes en el CAULE entre 2007 y 2008, confirmándose la presencia de una población endémica clonal en el ambiente hospitalario español. Pese a que como resultado de estos estudios se detectaron linajes de *S. aureus* asociados al ganado ovino representados por los ST130-SARM-XI (*mecC*-SARM) y

ST398-SARM-IV/V, así como la presencia del linaje ST8-SARM-IV, de procedencia extracomunitaria europea, ninguno de ellos fue observado en el estudio hospitalario, lo que permite concluir que al menos actualmente, y a pesar de su emergencia mundial, su presencia es infrecuente en el entorno clínico.

7. Aislamos *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con el gen *mecC* en ganado ovino por primera vez en España, lo que posee trascendencia desde el punto de vista clínico, pues con los métodos de detección habituales no se puede descubrir su presencia, lo que permite concluir la necesidad de incorporar nuevos sistemas de diagnóstico que permitan su detección.
8. En el conjunto de estudios que forman parte de esta Tesis Doctoral se detectó la presencia de aislados de *Listeria monocytogenes* de genotipos epidémicos y de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de linajes genéticos asociados a la comunidad (ST8-SARM-IV) y al ganado (ST398-SARM-IV/V), en muestras de alimentos decomisados procedentes del exterior de la UE, demostrando que la importación y venta clandestina de alimentos procedentes de terceros países constituyen rutas de diseminación habituales tanto de microorganismos resistentes a antibióticos, como de linajes epidémicos de patógenos de transmisión alimentaria, cuya vigilancia debe ser objeto de los programas de control.
9. El estudio de los aislados de *Listeria monocytogenes* que produjeron listeriosis en el CAULE entre 2006 y 2014, permitió demostrar un brote de la enfermedad en 2009 que había pasado inadvertido. Estos resultados demuestran una vez más que la aplicación de la epidemiología molecular es muy útil en la investigación rápida del origen de brotes de enfermedades, limitando su impacto económico y sobre la Salud Pública.
10. La coincidencia de un pequeño número de clones de *L. monocytogenes*, que fueron detectados tanto de alimentos importados de forma clandestina desde países extracomunitarios, como del CAULE, confirma su circulación internacional.
11. Los dos brotes de tularemia en humanos que tuvieron lugar en Castilla y León en 1997 y 2007, fueron causados por el mismo grupo de genotipos relacionados filogenéticamente pertenecientes al subclado B.FTNF002-00, que está ampliamente distribuido en Europa Central y Occidental. Este resultado apunta a que la reemergencia de la tularemia en Castilla y León en 2007, tras 10 años de silencio epidemiológico, probablemente no fue debida a la introducción de cepas exóticas,

sino a la persistencia de reservorios locales de infección hasta el momento desconocidos, lo que sugiere que se han establecido focos endémicos de tularemia en nuestra Comunidad Autónoma.

12. Durante los brotes de tularemia en Castilla y León circularon los mismos genotipos de *Francisella tularensis* tipo B en todos los hospedadores estudiados, humanos y animales, por lo que no es posible establecer qué especie o especies pudieran considerarse en sentido estricto el reservorio fundamental del patógeno en periodos interepidémicos.
13. En su conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran el valor añadido de la aplicación de la estrategia "One Health", mediante el desarrollo de estudios multidisciplinarios e integrados que consideran todos los factores implicados en la epidemiología de las enfermedades infecciosas, independientemente de su naturaleza.

Capítulo 6

Referencias bibliográficas

- Aarestrup F. 2012. Sustainable farming: Get pigs off antibiotics. *Nature*. 486:465-466.
- Al-Momani W, Abo-Shehada MN y Nicholas RA. 2011. Seroprevalence of and risk factors for *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* infection in small ruminants in Northern Jordan. *Trop Anim Health Prod*. 43:463-469.
- Al-Momani W, Nicholas RAJ y Abo-Shehada MN. 2008. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Prev Vet Med*. 83:1-10.
- Alexandratos N y Bruinsma J. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. Global Perspective Studies Team. FAO Agricultural Development Economics Division.
- Allerberger F y Wagner M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect*. 16:16-23.
- Allue M, Sopeña CR, Gallardo MT, Mateos L, Vian E, Garcia MJ y cols. 2008. Tularemia outbreak in Castilla y León, Spain, 2007: an update. *Euro Surveill*. 13 pii: 18948.
- Anda P, Segura del Pozo J, Díaz García JM, Escudero R, García Peña FJ, López Velasco MC y cols. 2001. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis*. 7:575-582.
- Archer GL y Niemeyer DM. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *staphylococci*. *Trends Microbiol*. 2:343-347.
- Ariza-Miguel J, Fernández-Natal MI, Soriano F, Hernández M, Stessl B y Rodríguez-Lázaro D. 2015. Molecular Epidemiology of Invasive Listeriosis due to *Listeria monocytogenes* in a Spanish Hospital over a Nine-Year Study Period, 2006–2014. *Biomed Res Int*. ID 191409.
- Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I y Rodríguez-Lázaro D. 2014a. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in livestock in Spain. *J Clin Microbiol*. 52:4067-4069.
- Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I y Rodríguez-Lázaro D. 2014b. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital in northwestern Spain. *International Microbiology*. 17:149-157.
- Ariza-Miguel J, Johansson A, Fernández-Natal MI, Martínez-Nistal C, Orduña A, Rodríguez-Ferri EF y cols. 2014c. Molecular investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997-2008. *Emerg Infect Dis*. 20:754-761.
- Ariza-Miguel J, Rodríguez-Lázaro D y Hernández M. 2012. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. *BMC Vet Res*. 8:171.
- Ariza-Miguel J, Rodríguez-Lázaro D y Hernández M. 2013. Molecular characterization of *Mycoplasma agalactiae* reveals the presence of an endemic clone in Spain. *J Clin Microbiol*. 51:656-660.
- Assunção P, De la Fe C, Ramirez AS, Andrada M y Poveda JB. 2004. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. *Vet Rec*. 154:684-687.

- Avery FW y Barnett TB. 1967. Pulmonary tularemia: a report of five cases and consideration of pathogenesis and terminology. *Am Rev Respir Dis.* 95:584-591.
- Bäckman S, Näslund J, Forsman M y Thelaus J. 2015. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci Rep.* 5:7793.
- Bailey R. 1999. Eye infections in the tropics. En *Infectious Diseases*, Mosby, Philadelphia, págs. 6.21.21–26.21.26.
- Barrado L, Viedma E, Vindel A, Otero JR y Chaves F. 2013. Draft Genome Sequence of Strain SA_ST125_MupR of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST125, a Major Clone in Spain. *Genome Announc.* 1 pii:e00588-13.
- Benito D, Gómez P, Aspiroz C, Zarazaga M, Lozano C y Torres C. 2015. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from humans related to a livestock farm in Spain, with detection of MRSA-CC130 carrying *mecC* gene: A zoonotic case?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* pii: S0213-005X(15)00118-4.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 2: (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria). Edited by Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM. Springer, New York.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Editado por Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D., Parte, A. Springer, New York.
- Bergonier D, Berthelot X y Poumarat F. 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev Sci Tech.* 16:848-873.
- Berrada ZL y Telford SR 3rd. 2010. Diversity of *Francisella* species in environmental samples from Martha's Vineyard, Massachusetts. *Microb Ecol.* 59:277-283.
- Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C y cols. 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:526-532.
- Bhargava K, Wang X, Donabedian S, Zervos M, de Rocha L y Zhang Y. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. *Emerg Infect Dis.* 17:1135-1137.
- Birdsell DN, Johansson A, Öhrman C, Kaufman E, Molins C, Pearson T y cols. 2014. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* group A.I, United States. *Emerg Infect Dis.* 20:861-865.
- BOCYL, núm. 56, 22 de marzo de 2011, págs. 20062-20064.
- BOE, núm. 188, 7 de agosto de 1972, págs. 14311-2.
- BOE, núm. 244, 11 octubre 1973, págs. 19674-5.
- BOE, núm. 35, 10 febrero 1975, págs. 2810-1.
- BOE, núm. 65, 17 de marzo de 2015, págs. 24012-24015.

- Boletín de Información Agraria de Castilla y León, nº12. 2008. Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería.
- Boletín Epidemiológico Semanal. 1997. Instituto Carlos III. Vol.5, nº26. Págs. 249-256.
- Bousfield B y Brown R. 2011. One World One Health. Veterinary Bulletin - Agriculture, Fisheries, and Conservation Department Newsletter. Último acceso 22 de octubre del 2015. http://sc.afcd.gov.hk/TuniS/afcd.gov.hk/english/quarantine/qua_vb/files/OWOH2.pdf.
- Bresalier M, Cassidy A y Woods A. 2015. One Health in History. En One Health. The Theory and Practice of Integrated Health Approaches. Editado por Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Whittaker M y Tanner M. CPI Group Ltd, UK, págs. 1-15.
- Brown SL, McKinney FT, Klein GC y Jones WL. 1980. Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for *Francisella tularensis* antibodies. *J Clin Microbiol.* 11:146-148.
- Buonavoglia D, Greco G, Corrente M, Greco MF, D'Abramo M, Latronico F y cols. 2010. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. *Res Vet Sci.* 88:16-19.
- Buonavoglia D, Greco G, Quaranta V, Corrente M, Martella V y Decaro N. 2008. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol.* 31:117-123.
- Buyukcangaz E, Velasco V, Sherwood JS, Stepan RM, Koslofsky RJ y Logue CM. 2013. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States. *Foodborne Pathog Dis.* 10:608-617.
- Cairns BJ y Payne RJ. 2009. Sudden increases in listeriosis rates in England and Wales, 2001 and 2003. *Emerg Infect Dis.* 15:465-468.
- Cameron A, Gardner I, Doherr MG y Wagner B. Capítulo 4: Sampling Considerations in Surveys and Monitoring and Surveillance Systems. En Salman MD. 2003. Animal Disease Surveillance and Survey Systems. Methods and Applications. Editado por Salman MD. 1ª edición. Iowa State Press. Págs. 47-66.
- Camoez M, Sierra JM, Pujol M, Hornero A, Martin R y Domínguez MA. 2013. Prevalence and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 resistant to tetracycline at a Spanish hospital over 12 years. *PLoS One.* 8:e72828.
- CDC, página web. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.cdc.gov/onehealth>
- Centers for Disease Control and Prevention, página web. Listeria (Listeriosis). Último acceso 22 de octubre del 2015. www.cdc.gov/listeria/prevention.html
- Chanturia G, Birdsell DN, Kekelidze M, Zhgenti E, Babuadze G, Tsertsvadze N y cols. 2011. Phylogeography of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* from the country of Georgia. *BMC Microbiol.* 11:139.
- Chazel M, Tardy F, Le Grand D, Calavas D y Poumarat F. 2010. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet Res.* 6:32.

- Chenal-Franco V, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A y cols. 2011. Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis*. 17:1110-1112.
- Corrales JC, Esnal A, De la Fe C, Sánchez A, Assuncao P, Poveda JB y cols. 2007. Contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Res*. 68:154-166.
- Corrales JC, Sánchez A, Luengo C, Poveda JB y Contreras A. 2004. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano-Granadina goat herds. *J Dairy Sci*. 87:3165-3171.
- Couto N, Tilley P, Simões J, Sales-Luis JP y Pomba C. 2012. First Report of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST5 and ST398 from Purebred Lusitano Horses. *J Equine Vet Sci*. 32:300-304.
- Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M y cols. 2004. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:4240-4245.
- Cullor JS. 1997. HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points): is it coming to the dairy?. *J Dairy Sci*. 80:3449-3452.
- Cuny C, Layer F, Strommenger B y Witte W. 2011. Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. *PLoS One*. 6:e24360.
- De Azevedo EO, De Alcântara MDB, Do Nascimento ER, Tabosa IM, Barreto ML, De Almeida JF y cols. 2006. Contagious Agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz J Microbiol*. 37:576-581.
- De Boer E, Zwartkruis-Nahuis JT, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T y cols. 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol*. 134:52-56.
- De Garnica ML, Rosales RS, Gonzalo C, Santos JA y Nicholas RA. 2013. Isolation, molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of isolates of *Mycoplasma agalactiae* from bulk tank milk in an endemic area of Spain. *J Appl Microbiol*. 114:1575-1581.
- De la Fe C, Amores J, Tardy F, Sagne E, Nouvel LX y Citti C. 2012. Unexpected genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. *BMC Vet Res*. 8:146.
- De la Fe C, Assunção P, Antunes T, Rosales RS y Poveda JB. 2005. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *Vet J*. 170:257-259.
- De la Fe C, Assunção P, Saavedra P, Tola S, Poveda C y Poveda JB. 2007a. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. *Vaccine*. 25:2340-2345.
- De la Fe C, Gutiérrez A, Poveda JB, Assunção P, Ramírez AS y Fabelo F. 2007b. First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, one of the causal agents of caprine contagious agalactia, on the island of Lanzarote (Spain). *Vet J*. 173:440-442.

- De Mateo S y Coisin CR. 1998. Outbreak of tularaemia in Castilla y León, Spain. *Euro Surveill.* <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1268>.
- Dempsey MP, Dobson M, Zhang C, Zhang M, Lion C, Gutiérrez-Martín CB y cols. 2007. Genomic deletion marking an emerging subclone of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France and the Iberian Peninsula. *Appl Environ Microbiol.* 73:7465-7470.
- Den Bakker HC, Manuel CS, Fortes ED, Wiedmann M y Nightingale KK. 2013. Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:3257-3268.
- Department of Health and Human Services. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-10-05/html/2012-24389.htm>
- Dermota U, Zdovc I, Strumbelj I, Grmek-Kosnik I, Ribic H, Rupnik M y cols. 2015. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples in Slovenia. *Epidemiol Infect.* 143:1105-1108.
- Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S y Malik SV. 2015. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet Q.* 15:1-25.
- Díez-Navarro A, Gonzalez-Díez E y García-Sanz A. 1994. Cuadernos de Leyes y Privilegios del Honrado Concejo de la Mesta. Lex Nova, Madrid.
- Digoutte JP. 1999. [Present status of an arbovirus infection: yellow fever, its natural history of hemorrhagic fever, Rift Valley fever]. *Le Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 92:343-348.
- Doorduyn Y, de Jager CM, van der Zwaluw WK, Wannet WJ, van der Ende A, Spanjaard L y cols. 2006. Invasive *Listeria monocytogenes* infections in the Netherlands, 1995-2003. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 25:433-442.
- Drevets DA y Bronze MS. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 53:151-165.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13:3991.
- Ellis J, Oyston PC, Green M y Titball RW. 2002. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* 15:631-646.
- Enderlin G, Morales L, Jacobs RF y Cross JT. 1994. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis.* 19:42-47.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ y Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38:1008-1015.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H y Spratt BG. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7687-7692.

- Enserink M. 2010. Infectious diseases. Humans, animals – it's one health. Or is it?. *Science*. 327:266-267.
- Erdag O. 1989. Investigation on the preparation and application of vaccine against contagious *Mycoplasma agalactia* for sheep and goats in Turkey. *Proceeding of International Symposium on Mycoplasma*. Págs. 20-22.
- European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition.
- FAO, página web. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.fao.org>
- FAO. El papel de la FAO en la sanidad animal. Último acceso 26 de octubre del 2015. <http://www.fao.org/animal-health/es>
- Fargallo JA, Martínez-Padilla J, Viñuela J, Blanco G, Torre I, Vergara P y cols. 2009. Kestrel-prey dynamic in a Mediterranean region: the effect of generalist predation and climatic factors. *PLoS One*. 4:e4311.
- Farlow J, Wagner DM, Dukerich M, Stanley M, Chu M, Kubota K y cols. 2005. *Francisella tularensis* in the United States. *Emerg Infect Dis*. 11:1835-1841.
- FDA. 2015. Report on Antimicrobials Sold or Distributed for use in Food-Producing Animals. Último acceso 26 de octubre del 2015. <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM440584.pdf>
- Filioussis G, Petridou E, Giadinis ND y Kritas SK. 2014. In vitro susceptibilities of caprine *Mycoplasma agalactiae* field isolates to six antimicrobial agents using the E test methodology. *Vet J*. 202:654-656.
- Foley JE y Nieto NC. 2010. Tularemia. *Vet Microbiol*. 140:332-338.
- Furneri PM, Rappazzo G, Musumarra MP, Di Pietro P, Catania LS y Roccasalva LS. 2001. Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:2958-2960.
- García Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, De La Puente VA, Gutiérrez CB, Hadfield TL y cols. 2002. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 40:2964-2972.
- García del Blanco N, Gutiérrez Martín CB, de la Puente Redondo VA y Rodríguez Ferri EF. 2004. In vitro susceptibility of field isolates of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* recovered in Spain to several antimicrobial agents. *Res Vet Sci*. 76:195-198.
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD y cols. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 11:595-603.
- García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J y cols. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother*. 69:45-50.

- Gehring H, Schacht E, Maylaender N, Zeman E, Kaysser P, Oehme R y cols. 2013. Presence of an emerging subclone of *Francisella tularensis holarctica* in *Ixodes ricinus* ticks from south-western Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 4:93-100.
- Gelasakis AI, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NG y Fthenakis GC. 2015. Mastitis in sheep - The last 10 years and the future of research. *Vet Microbiol.* S0378-1135(15)00271-0.
- Gharsa H, Ben Slama K, Lozano C, Gómez-Sanz E, Klibi N, Ben Sallem R y cols. 2012. Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Vet Microbiol.* 156:367-373.
- Gil MC, Hermoso de Mendoza M, Rey J, Alonso JM, Poveda JB y Hermoso de Mendoza J. 1999. Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extremadura, Spain. *Vet Rec.* 144:24-25.
- Gill V y Cunha BA. 1997. Tularemia pneumonia. *Semin Respir Infect.* 12:61-67.
- Gómez P, González-Barrio D, Benito D, García JT, Viñuela J, Zarazaga M y cols. 2014. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 69:2061-2064.
- Gómez P, Lozano C, González-Barrio D, Zarazaga M, Ruiz-Fons F y Torres C. 2015. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in a semi-extensive red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) farm in Southern Spain. *Vet Microbiol.* 177:326-331.
- Gómez-Martín A, Amores J, Paterna A y De la Fe C. 2013. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: epidemiology and prospects for diagnosis and control. *Vet J.* 198:48-56.
- Gómez-Martín A, De la Fe C, Amores J, Sánchez A, Contreras A, Paterna A y cols. 2012. Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers. *Vet Microbiol.* 157:355-362.
- Goncer Coca A. 1989. Estudio de Mycoplasmas y Ureaplasmas en ovinos y caprinos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense. Madrid.
- Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A y de Valk H. 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis.* 14:734-740.
- Graves LM y Swaminathan B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol.* 65:55-62.
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE y cols. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:1280-1288.
- Greco G, Corrente M, Buonavoglia D, Aliberti A y Fasanella A. 2002. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol.* 25:17-20.

- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF y cols. 2010. Human Listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* 16:136-138.
- Gurycová D. 1998. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol.* 14:797-802.
- Gyuranecz M, Birdsell DN, Spletstoeser W, Seibold E, Beckstrom-Sternberg SM, Makrai L y cols. 2012. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg Infect Dis.* 18:290-293.
- Hanson BM, Dressler AE, Harper AL, Scheibel RP, Wardyn SE, Roberts LK y cols. 2011. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *J Infect Public Health.* 4:169-174.
- Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Larsen J, Stegger M, Larsen AR y cols. 2013. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med.* 5:509-515.
- Hedberg C. 2006. Listeria in Europe: the need for a European surveillance network is growing. *Euro Surveill.* 11:75-76.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S y cols. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 350:1670-1673.
- Hirsh DC. 2000. Mycoplasmas. En Prescott JF, Baggot JD, Walker RD (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Iowa State University Press, Ames, págs. 466-468.
- Hoffmann S y Anekwe TD. 2013. Making Sense of Recent Cost of Foodborne Illness Estimates. EIB-118, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service.
- Hoffmann S, Batz MB y Morris JG Jr. 2012. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot.* 75:1292-1302.
- Hopla CE y Hopla AK. 1994. Tularemia. En Beran GW, Steele JH (Eds.), *Handbook of zoonoses*. 2ª edición. Boca Raton: CRC Press, Inc., págs. 113-126.
- Hueston W, Appert J, Denny T, King L, UMBER J y Valeri L. 2013. Assessing Global Adoption of One Health Approaches. *Ecohealth.* 10:228-233.
- Ikäheimo I, Syrjälä H, Karhukorpi J, Schildt R y Koskela M. 2000. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* 46:287-290.
- International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG-SCC) server. Último acceso 22 de octubre del 2015. www.sccmec.org/Pages/SCC:TypesEN.html
- Jackson KA, Biggerstaff M, Tobin-D'Angelo M, Sweat D, Klos R, Nosari J y cols. 2011. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. *J Food Prot.* 74:949-953.

- JCYL, superficies de cultivos por provincias, comarcas y municipios 2008. Último acceso 27 de octubre del 2015. http://www.agriculturaganaderia.jcyl.es/web/jcyl/AgriculturaGanaderia/es/Plantilla100/1284193629805/_/_/
- Jevons MP. 1961. "Celebenin"-resistant *staphylococci*. *Brit Med J*. 1:124-125.
- Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Byström M y cols. 2004. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol*. 186:5808-5818.
- Johansson A, Ibrahim A, Göransson I, Eriksson U, Gurycova D, Clarridge JE 3rd y cols. 2000. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol*. 38:4180-4185.
- Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M y Schaffner W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 8:82-84.
- Karlsson E, Svensson K, Lindgren P, Byström M, Sjödin A, Forsman M y cols. 2013. The phylogeographic pattern of *Francisella tularensis* in Sweden indicates a Scandinavian origin of Eurosiberian tularaemia. *Environ Microbiol*. 15:634-645.
- Katayama Y, Ito T y Hiramatsu K. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:1549-1555.
- Kaysser P, Seibold E, Mätz-Rensing K, Pfeffer M, Essbauer S y Splettstoesser WD. 2008. Re-emergence of tularemia in Germany: presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. *BMC Infect Dis*. 8:157.
- Keim PS y Wagner DM. 2009. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nat Rev Microbiol*. 7:813-821.
- Kilbourne ED. 1973. The Molecular Epidemiology of Influenza. *J Infect Dis*. 127:478-487.
- Kim C, Milheiriço C, Gardete S, Holmes MA, Holden MT, de Lencastre H y cols. 2012. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem*. 287:36854-36863.
- Kinde H, DaMassa AJ, Wakenell PS y Petty R. 1994. Mycoplasma infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). *J Vet Diagn Invest*. 6:423-427.
- King LJ. 2012. One Health and Food Safety. En *Improving Food Safety Through a One Health Approach*. IOM (Institute of Medicine). Washington, DC: The National Academies Press. Págs. 218-225.
- Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L y cols. 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J Clin Microbiol*. 33:1121-1128.

- Koch J y Stark K. 2006. Significant increase of listeriosis in Germany--epidemiological patterns 2001-2005. *Euro Surveill.* 11:85-88.
- Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J y cols. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 15:19688.
- Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J y cols. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:264-274.
- Koop G, Rietman JF y Pieterse MC. 2010. *Staphylococcus aureus* mastitis in Texel sheep associated with suckling twins. *Vet Rec.* 167:868-869.
- Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y y Petersen JM. 2006. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerg Infect Dis.* 12:1799-1801.
- Kumar A, Rahal A, Chakraborty S, Verma AK y Dhama K. 2014. *Mycoplasma agalactiae*, an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. *Vet Med Int.* 2014:286752.
- Lambert M. 1987. Contagious agalactia of sheep and goats. *Rev Sci Tech.* 6:699-711.
- Lang Halter E, Neuhaus K y Scherer S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:641-647.
- Larsen J, Petersen A, Sørnum M, Stegger M, van Alphen L, Valentiner-Branth P y cols. 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. *Euro Surveill.* 20: 17 de septiembre del 2015.
- Larson MA, Fey PD, Hinrichs SH y Iwen PC. 2014. *Francisella tularensis* bacteria associated with feline tularemia in the United States. *Emerg Infect Dis.* 20:2068-2071.
- Larsson P, Svensson K, Karlsson L, Guala D, Granberg M, Forsman M y cols. 2007. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg Infect Dis.* 13:1725-1732.
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Flèche-Matéos A, Roche SM y cols. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:2210-2214.
- León-Vizcaíno L, Garrido Abellán F, Cubero Pablo MJ y Perales A. 1995. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. *Vet Rec.* 137:266-269.
- Long GW, Oprandy JJ, Narayanan RB, Fortier AH, Porter KR y Nacy CA. 1993. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 31:152-154.
- López C. 1952. [Agalaxie contagieuse]. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France.* 25:23-25.
- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339:520-532.

- Lozano C, Gómez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M y Torres C. 2011. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol.* 301:500-505.
- Lozano C, López M, Gómez-Sanz E, Ruiz-Larrea F, Torres C y Zarazaga M. 2009. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 64:1325-1326.
- Lundström JO, Andersson AC, Bäckman S, Schäfer ML, Forsman M y Thelaus J. 2011. Transstadial Transmission of *Francisella tularensis holarctica* in Mosquitoes, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 17:794-799.
- Luque-Larena JJ, Mougeot F, Roig DV, Lambin X, Rodríguez-Pastor R, Rodríguez-Valín E y cols. 2015. Tularemia Outbreaks and Common Vole (*Microtus arvalis*) Irruptive Population Dynamics in Northwestern Spain, 1997-2014. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15:568-570.
- Luque-Larena JJ, Mougeot F, Viñuela J, Jareño D y cols. 2013. Recent large-scale range expansion and outbreaks of the common vole (*Microtus arvalis*) in NW Spain. *Basic Appl Ecol.* 14:432-441.
- Lysnyansky I, Mikula I, Gerchman I y Levisohn S. 2009. Rapid detection of a point mutation in the *parC* gene associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:4911-4914.
- Macun HC, Ocal N, Karahan M, Yagci BB, Kalender H y Kalin R. 2010. Endemic contagious agalactia in sheep and goats: Clinical evaluation, treatment and vaccination. *J Anim Vet Adv.* 9: 1918-1924.
- MAGRAMA, Informe de la Industria Alimentaria 2013-2014. Último acceso 27 de octubre del 2015. [http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_informeindustriaalimentaria 2013-2014_tcm7-156934.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/_informeindustriaalimentaria%202013-2014_tcm7-156934.pdf)
- Mangili A y Gendreau MA. 2005. Transmission of infectious diseases during commercial air travel. *The Lancet.* 365:989-996.
- Manso-Silván L, Perrier X y Thiaucourt F. 2007. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:2247-2258.
- Manso-Silván L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, Thiaucourt F y Frey J. 2009. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:1353-1358.
- Marois C, Dufour-Gesbert F y Kempf I. 2001. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. *Vet Microbiol.* 79:1-9.
- Martin C, Gallardo MT, Mateos L, Vian E, Garcia MJ, Ramos J y cols. 2007. Outbreak of tularaemia in Castilla y León, Spain. *Euro Surveill.* [http://www.eurosurveillance.org/View Article.aspx?ArticleId=3302](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3302)

- Matsuhashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M y cols. 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 167:975-980.
- Mavrogianni VS, Menzies PI, Fragkou IA y Fthenakis GC. 2011. Principles of mastitis treatment in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 27:115-120.
- McAuliffe L, Churchward CP, Lawes JR, Loria G, Ayling RD y Nicholas RA. 2008. VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. *BMC Microbiol.* 8:193.
- McAuliffe L, Gosney F, Hlusek M, de Garnica ML, Spersger J, Kargl M y cols. 2011. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *J Med Microbiol.* 60:803-811.
- McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling RD y Nicholas RA. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *J Clin Microbiol.* 42:4556-4565.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK y Tenover FC. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol.* 41:5113-5120.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Caracterización del sector ovino y caprino en España. Año 2013. Último acceso 22 de octubre del 2015. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/CARACTERIZACIÓN_DEL_SECTOR_OVINO_Y_CAPRINO_EN_ESPAÑA_2013_tcm7-271704.pdf
- Mørk T, Waage S, Tollersrud T, Kvitle B y Sviland S. 2007. Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Vet Scand.* 49:23.
- Morner TR, Mattsson M, Forsman KE, Johansson y Sandstrom G. 1993. Identification and classification of different isolates of *Francisella tularensis*. *Zentralbl Veterinarmed.* 40:613-620.
- Müller W, Hotzel H, Otto P, Karger A, Bettin B, Bocklisch H y cols. 2013. German *Francisella tularensis* isolates from European brown hares (*Lepus europaeus*) reveal genetic and phenotypic diversity. *BMC Microbiol.* 13:61.
- Naing L, Winn T y Rusli BN. 2006. Practical Issues in Calculating the Sample Size for Prevalence Studies. *Archives of Orofacial Sciences.* 1: 9-14.
- Nicholas RAJ. 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin Res.* 45:145-149.
- Nicogosian A. 2015. Education to avoid Antimicrobial Resistance. En WVA/WMA global conference on One Health. Madrid 21-22 de mayo.
- Notifiable diseases. 2014. Contagious agalactia pathogen confirmed in Wales. *Vet Rec.* 175:468.

- Nouvel LX, Marena MS, Glew MD, Sagné E, Giammarinaro P, Tardy F y cols. 2012. Molecular typing of *Mycoplasma agalactiae*: tracing European-wide genetic diversity and an endemic clonal population. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 35:487-496.
- O'Neill J. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Último acceso 26 de octubre del 2015. http://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
- OCDE. 2015. Report on Global Antimicrobial Use in the Livestock Sector. Último acceso 26 de octubre del 2015. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=TAD/CA/APM/WP\(2014\)34/FINAL&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=TAD/CA/APM/WP(2014)34/FINAL&docLanguage=En)
- OIE, Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Último acceso 22 de marzo del 2015. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogenes.pdf
- OIE, página web. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.oie.int>
- OIE, página web. Impact of animal diseases on meat and milk production in the world. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.rrafrica.oie.int/en/news/index.html>
- OIE, Terrestrial Animal Health Code 2010. Último acceso 22 de marzo del 2015. http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.14.3.htm
- OIE, Terrestrial Manual. 2008. Último acceso 26 de octubre del 2015. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.18_TULAREMIA.pdf
- Okpo E, Leith J, Smith-Palmer A, Bell J, Parks D, Browning F y cols. 2015. An outbreak of an unusual strain of *Listeria monocytogenes* infection in North-East Scotland. *J Infect Public Health*. 8:612-618.
- Oliveira DC y de Lencastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 46:2155-2161.
- Oliveira DC, Tomasz A y de Lencastre H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*. 2:180-189.
- One Health Initiative, página web. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.onehealthinitiative.com>
- Oniciuc EA, Ariza-Miguel J, Bolocan AS, Diez-Valcarce M, Rovira J, Hernández M y cols. 2014. Foods from black market at EU border as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int J Food Microbiol*. pii: S0168-1605(14)00566-2.
- Ooi ST y Lorber B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis*. 40:1327-1332.

- Oravcová K, López-Enríquez L, Rodríguez-Lázaro D y Hernández M. 2009. *Mycoplasma agalactiae* p40 Gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J Clin Microbiol.* 47:445-450.
- Origi FC, Frey J y Pilo P. 2014. Characterisation of a new group of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Switzerland with altered antimicrobial susceptibilities, 1996 to 2013. *Euro Surveill.* 19 pii:20858.
- Orsi RH, den Bakker HC y Wiedmann M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.* 301:79-96.
- Otter JA y French GL. 2010. Molecular epidemiology of community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis.* 10:227-239.
- Pagel SW y Gautier P. 2012. Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech.* 31:145-188.
- Pantosti A. 2012. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. *Front Microbiol.* 3:127.
- Papadopoulos A y Wilmer S. 2011. One Health: A Primer. National Collaborating Centre for Environmental Health. Último acceso 22 de octubre del 2015. http://ncceh.ca/sites/default/files/One_Health_Primer_Nov_2011.pdf
- Paterna A, Sánchez A, Gómez-Martín A, Corrales JC, De la Fe C, Contreras A y cols. 2013. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from dairy goats. *J Dairy Sci.* 96:7073-7076.
- Paterson GK, Harrison EM y Holmes MA. 2014a. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22:42-47.
- Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN y cols. 2014b. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.* 69:598-602.
- Pérez-Castrillón JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M, Mena-Martín FJ y Herreros V. 2001. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis.* 33:573-576.
- Pérez-Trallero E, Zigorraga C, Artieda J, Alkorta M y Marimón JM. 2014. Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. *Emerg Infect Dis.* 20:2155-2157.
- Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C, Oteo J, Cuevas O, Trincado P y cols. 2009. Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4')-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother.* 63:21-31.
- Peyraud A, Woubit S, Poveda JB, De la Fe C, Mercier P y Thiaucourt F. 2003. A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Mol Cell Probes.* 17:289-294.

- Pilo P, Johansson A y Frey J. 2009. Identification of *Francisella tularensis* cluster in central and western Europe. *Emerg Infect Dis.* 15:2049-2051.
- Porrero MC, Valverde A, Fernández-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, Lavín S y cols. 2014. *Staphylococcus aureus* Carrying *mecC* Gene in Animals and Urban Wastewater, Spain. *Emerg Infect Dis.* 20:899-901.
- Posfay-Barbe KM y Wald ER. 2009. Listeriosis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 14:228-233.
- Prasad SK. 2009. Biological Agents, Volumen 2. *Discovery Publishing House.*
- Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A y cols. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 4:e1000146.
- Rastawicki W y Wolaniuk N. 2013. [Comparison of usefulness of commercial ELISA Virion/Serion, homemade ELISA and tube agglutination test in serodiagnosis of tularemia]. *Med Dosw Mikrobiol.* 65:255-261.
- Real F, Déniz S, Acosta B, Ferrer O y Poveda JB. 1994. Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. *Vet Rec.* 135:15-16.
- Rebagliati V, Philippi R, Rossi M y Troncoso A. 2009. Prevention of foodborne listeriosis. *Indian J Pathol Microbiol.* 52:145-149.
- Rocourt J y Bille J. 1997. Foodborne listeriosis. *World Health Stat Q.* 50:67-73.
- Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H y Schlundt J. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35:263-267.
- Rodríguez-Ferri EF. 2007. Tularemia. Brote nuevo en Castilla y León en 2007. Profesión veterinaria. Volumen 16. Nº. 67, págs. 74-86.
- Rodríguez-Lázaro D, Ariza-Miguel J, Díez-Valcarce M, Fernández-Natal I, Hernández M y Rovira J. 2014a. Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int J Food Microbiol.* pii: S0168-1605(14)00420-6.
- Rodríguez-Lázaro D, Ariza-Miguel J, Díez-Valcarce M, Stessl B, Beutlich J, Fernández-Natal I y cols. 2014b. Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. *Int J Food Microbiol.* pii: S0168-1605(14)00520-0.
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M y Pla M. 2004a. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *FEMS Microbiol Lett.* 233:257-267.
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Scortti M, Esteve T, Vázquez-Boland JA y Pla M. 2004b. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. *Appl Environ Microbiol.* 70:1366-1377.

- Rodríguez-Lázaro D, López-Enríquez L y Hernández M. 2010. *smcL* as a novel diagnostic marker for quantitative detection of *Listeria ivanovii* in biological samples. *J Appl Microbiol.* 109:863-872.
- Rossow H, Forbes KM, Tarkka E, Kinnunen PM, Hemmilä H, Huitu O y cols. 2014. Experimental Infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. *PLoS One.* 9:e108864.
- Sakoulas G y Moellering RC Jr. 2008. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Infect Dis.* 46:S360-367.
- Saleh-Lakha S, Allen VG, Li J, Pagotto F, Odumeru J, Taboada E y cols. 2013. Subtyping of a large collection of historical *Listeria monocytogenes* strains from Ontario, Canada, by an improved multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). *Appl Environ Microbiol.* 79:6472-6480.
- Sanna G, Lecca V, Foddai A y Tola S. 2014. Development of a specific immunomagnetic capture-PCR for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples. *J Appl Microbiol.* 117:1585-1591.
- Saslaw S, Eigelsbach HT, Prior JA, Wilson HE y Carhart S. 1961a. Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Arch Intern Med.* 107:702-714.
- Saslaw S, Eigelsbach HT, Wilson HE, Prior JA y Carhart S. 1961b. Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. *Arch Intern Med.* 107:689-701.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL y cols. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17:7-15.
- Scharff RL. 2010. Health-related Costs from Foodborne Illness in the United States. Produce Safety Project, Georgetown University, Washington, DC.
- Scharff RL. 2012. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot.* 75:123-131.
- Schmitt P, Spletstösser W, Porsch-Ozcürümez M, Finke EJ y Grunow R. 2005. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol Infect.* 133:759-766.
- Shahram M, Nicholas RA, Wood AP y Kelly DP. 2010. Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Large Colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. *Syst Appl Microbiol.* 33:20-24.
- Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S y cols. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3765-3773.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L y Health Care Infection Control Practices Advisory Committee. 2007. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control.* 35:S65-164.

- Sirand-Pugnet P, Lartigue C, Marena M, Jacob D, Barré A, Barbe V y cols. 2007. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet.* 3:e75.
- Skov R, Larsen AR, Kearns A, Holmes M, Teale C, Edwards G y cols. 2014. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. *J Antimicrob Chemother.* 69:133-135.
- Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE y Oliver SP. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog Dis.* 2:201-211.
- Staphylococcus aureus* multilocus sequence typing database. Último acceso 26 de octubre del 2015. <http://saureus.mlst.net/>
- Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G y cols. 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*(LGA251). *Clin Microbiol Infect.* 18:395-400.
- Svensson K, Bäck E, Eliasson H, Berglund L, Granberg M, Karlsson L y cols. 2009. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg Infect Dis.* 15:1937-1947.
- Swaminathan B y Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 9:1236-1243.
- Talegón-Heras. 1974. Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura. Número 19.
- Tardy F, Mercier P, Solsona M, Saras E y Poumarat F. 2007. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype large colony isolates from healthy and diseased goats: prevalence and typing. *Vet Microbiol.* 121:268-277.
- Tarnvik A, G Sandstrom y Sjostedt A. 1996. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden, 1931–1993. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 13:201-204.
- Tenover FC. 2006. Community- Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: It's Not Just in Communities Anymore. *Clin Microbiol Newsl.* 28:33-36.
- The World Bank, página web. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://data.worldbank.org/indicator/IS.AIR.PSGR>
- Thelaus J, Andersson A, Broman T, Bäckman S, Granberg M, Karlsson L y cols. 2014. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Microb Ecol.* 67:96-107.
- Tilman D, Balzer C, Hill J y Befort BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:20260-20264.
- Tola S, Manunta D, Rocca S, Rocchigiani AM, Idini G, Angioi PP y cols. 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine.* 17:2764-2768.

- Tompkin RB. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot.* 65:709-725.
- Troxler R, von Graevenitz A, Funke G, Wiedemann B y Stock I. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin Microbiol Infect.* 6:525-535.
- Ughetto E, Héry-Arnaud G, Cariou ME, Pelloux I, Maurin M y Caillon J. 2015. An original case of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* bacteremia after a near-drowning accident. *Infect Dis.* 47:588-590.
- UK antimicrobial resistance strategy. Último acceso 27 de octubre del 2015. www.gov.uk/government/collections/antimicrobial-resistance-amr-information-and-resources
- US Food and Drug Administration. 2013. Guidance for Industry #213: New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water of Food - Producing Animals : Recommendations for Drug Sponsors for Voluntarily Aligning Product Use Conditions with GFI #209.
- Valero FP y Rafart JV. 2014. [Incidence study of listeriosis in Spain]. *Gac Sanit.* 28:74-76.
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP y cols. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:5649-5654.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H y cols. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 9:978-984.
- Vanderhaeghen W, Serpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K y Butaye P. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol.* 144:166-171.
- Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K y Adley C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnol Adv.* 28:232-254.
- Verkade E, Bosch T, Hendriks Y y Kluytmans J. 2012. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch nursing home. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 33:624-626.
- Versage JL, Severin DD, Chu MC y Petersen JM. 2003. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol.* 41:5492-5499.
- Vidal D, Alzaga V, Luque-Larena JJ, Mateo R, Arroyo L y Viñuela J. 2009. Possible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen in common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak. *Sci Total Environ.* 408:267-271.
- Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C y cols. 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol.* 47:1620-1627.

- Vindel A, Trincado P, Gómez E, Cabrera R, Boquete T, Solá C y cols. 2006. Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *J Clin Microbiol.* 44:266-270.
- Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK y cols. 2009. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol.* 191:2474-2484.
- Vogler AJ, Birdsell DN, Lee J, Vaissaire J, Doujet CL, Lapalus M y cols. 2011. Phylogeography of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in France. *Lett Appl Microbiol.* 52:177-180.
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C y Wulf M. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* 11:1965-1966.
- Wang JT, Fang CT, Chen YC, Wu CL, Chen ML y Chang SC. 2007. Staphylococcal cassette chromosome *mec* in MRSA, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 13:494-497.
- Ward TJ, Usgaard T y Evans P. 2010. A targeted multilocus genotyping assay for lineage, serogroup, and epidemic clone typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 76:6680-6684.
- Weller D, Andrus A, Wiedmann M y Den Bakker HC. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65:286-292.
- WHO. 2005. The Control of Neglected Zoonotic Diseases. Report of a Joint WHO/DFID-AHP Meeting with the participation of FAO and OIE. Último acceso 27 de octubre del 2015. http://www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf
- WHO, página web. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.who.int>
- WHO, zoonosis. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.who.int/zoonoses>
- WHO, WHO guidelines on Tularemia. Último acceso 22 de octubre del 2015. <http://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf>
- Witte W, Strommenger B, Stanek C y Cuny C. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Humans and Animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases.* 13: 255-258.
- Woolhouse ME y Gowtage-Sequeria S. 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis.* 11:1842-1847.
- Woubit S, Manso-Silván L, Lorenzon S, Gaurivaud P, Poumarat F, Pellet MP y cols. 2007. A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: application to the diagnosis of contagious agalactia. *Mol Cell Probes.* 21:391-399.
- Zinsstag J, Schelling E, Roth F, Bonfoh B, de Savigny D y Tanner M. 2007. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerging Infectious Diseases* 13:527-531.
- Zinsstag J, Waltner-Toews D y Tanner M. 2015. Theoretical Issues of One Health. En One Health. The Theory and Practice of Integrated Health Approaches. Editado por

Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Whittaker M, y Tanner M. CPI Group Ltd, UK, págs. 16-25.

