



Utilidad del genotipado PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) como herramienta epidemiológica en el estudio de *Staphylococcus aureus*.

Tesis doctoral:

Isabel Aleixandre Górriz

La Dra M^a VICTORIA DOMÍNGUEZ MÁRQUEZ, (Profesora Asociada del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Valencia y Facultativo Especialista en Microbiología del Hospital General de Castellón), el Dr ANTONIO GUERRERO ESPEJO (Director de Investigación y Docencia, Departamento de Salud de la Ribera, en Alzira, y Profesor Agregado Parcial de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Valencia) y el Dr JOSE RAMÓN PENADÉS CASANOVA (Profesor del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU Cardenal Herrera)

INFORMAN QUE:

La Tesis Doctoral titulada: **UTILIDAD DEL GENOTIPADO PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) COMO HERRAMIENTA EPIDEMIOLÓGICA EN EL ESTUDIO DE *Staphylococcus aureus*** de la que es autora Dña Isabel Aleixandre Górriz, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones científicas y formales necesarias para su defensa.

En Valencia, a 1 de junio de 2012.

Fdo. M^a Victoria Domínguez Márquez

Fdo. Antonio Guerrero Espejo

Fdo. Jose R. Penadés Casanova

Agradecimientos

A Victoria por confiar en mí. Sin su estímulo, valiosos consejos, ayuda para superar las dificultades, y las innumerables horas dedicadas a elaborar esta tesis; no lo hubiera conseguido. Me considero muy afortunada por haber estado bajo tu tutoría.

A Antonio Guerrero por mantener constante mi ilusión por la investigación, aportando sus consejos, ánimo y facilitándome la realización de la tesis durante la residencia.

A todos los miembros del Laboratorio del Hospital Universitario de La Ribera, facultativos y técnicos, por formarme como especialista y hacer que me sintiera como en casa. A Sara por su disponibilidad constante, hacerme tan fácil el día a día durante la residencia y sobre todo, por su amistad. A Flor por su apoyo y buenos consejos. A Olalla por ser esa bocanada de aire fresco que llegó al laboratorio, por los muchos momentos de risas y complicidad que hemos pasado juntas. A Silvia por hacerme ver que podía confiar en una R pequeña.

Al Servicio de Microbiología de los hospitales que han participado en este proyecto, por su colaboración al cedernos cepas y datos epidemiológicos. Al Dr. Rafael Borrás por haberme facilitado los medios para llevar a cabo una gran parte de las actividades para el desarrollo de esta tesis y sus consejos. A todas las personas con las que compartí las mañanas en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. A Óscar por su colaboración, ayuda, paciencia y por hacerme más amenas y agradables las largas horas dedicadas al PFGE. Al Dr. Viana por su amabilidad y disponibilidad durante mis estancias en el IVIA. A Antonio Burgos por su ayuda para llevar adelante la PCR-RFLP.

A mis padres, porque con su apoyo incondicional, su cariño y su generosidad hacen sencilla mi vida. A Raquel por su complicidad, estar siempre ahí y ser como es. A Marta, por sus largas conversaciones y hacerme siempre sonreír. A Alejandro, siempre con las palabras exactas en el momento justo. A Manolo por su apoyo, “soporte técnico” y ánimo en las horas bajas. A las mejores amigas del mundo, Blanca y María, porque me encanta formar parte de vuestras vidas y que vosotras forméis parte de la mía.

A Carla, por hacer que cada momento a su lado sea asombroso e inolvidable. No te cambio por nada.

Índice General

1. Introducción	15
1.1. Microbiología de las infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.1.1. Descripción del género y características generales	17
1.1.2. Epidemiología	19
1.1.3. Factores de virulencia bacteriana	21
1.1.3.1. Componentes de la pared celular	21
1.1.3.2. Enzimas estafilocócicas	23
1.1.3.3. Toxinas estafilocócicas	24
1.1.3.4. Formación de biocapas	25
1.1.3.5. Leucocidina de Pantón Valentine (LPV)	27
1.2. Manifestaciones clínicas	28
1.3. Tratamiento de las infecciones	30
1.4. Mecanismos de resistencia	32
1.4.1. Evolución de la resistencia a los antimicrobianos	33
1.4.2. Mecanismo de resistencia en <i>S. aureus</i>	34
1.4.2.1. Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos	35
1.4.2.2. Mecanismo de resistencia a gluco y lipopéptidos	39
1.4.2.3. Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas	40
1.4.2.4. Resistencia a los aminoglucósidos	41
1.4.2.5. Resistencia a las fluorquinolonas	41
1.4.2.6. Resistencia a las oxazolidinonas	41
1.4.2.7. Resistencia a la Daptomicina	42
1.4.3. Situación actual en Europa	43
1.4.4. Medidas de prevención para el control de la propagación	46

1.5. Métodos de tipado molecular para estudios epidemiológicos	49
1.5.1. Electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE)	50
1.5.2. Tipado de secuencias multilocus (MLST)	52
1.5.3. Tipado mediante proteína A (<i>spa</i> Typing)	52
1.5.4. Amplificación de secuencias genéticas sin restricción posterior del producto obtenido (PCR)	53
1.5.5. Amplificación de secuencias genéticas con restricción del producto obtenido (PCR-RFLP)	54
1.5.6. Hibridación de múltiples secuencias (<i>Microarrays</i>)	56
2. Objetivos	59
3. Material y Métodos	65
3.1. Origen de los aislados	67
3.1.1. Recogida de datos	67
3.1.1.1. Hospital Universitario La Ribera	67
3.1.1.2. Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy y Hospital General de Castellón	69
3.2. Análisis microbiológico de los aislados	73
3.3. Detección del gen <i>MecA</i>	74
3.4. Detección de la leucocidina de Pantón-Valentine	76
3.5. Estudio genotípico de los aislados	77
3.5.1. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)	77
3.5.1.1. Técnica PCR-RFLP para el gen de la coagulasa	78
3.5.1.2. Técnica PCR –RFLP para el gen de la Proteína A	80
3.5.1.3. Técnica PCR para el gen del Clumping factor B	81
3.5.2. Electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE)	82

3.5.2.1	Proceso de extracción	82
3.5.2.2	Restricción del ADN	83
3.5.2.3	Electroforesis de los fragmentos de restricción	84
3.5.2.4	Interpretación de los resultados	85
3.5.3	Evaluación del poder de discriminación del PCR-RFLP (<i>coa-spa-clfB</i>) como método de tipado frente al PFGE	86
3.6.	Estudio de la concordancia entre métodos para la detección del brote de SARM en el Servicio de Medicina Intensiva	87
4.	Resultados	89
4.1.	Datos demográficos, clínicos y epidemiológicos	91
4.1.1	Hospital Universitario La Ribera	91
4.1.1.1	Procedencia de los aislados	91
4.1.1.2	Intervalo entre el ingreso y la adquisición de <i>S. aureus</i>	93
4.1.1.3	Enfermedades crónicas de base	93
4.2	Datos microbiológicos	95
4.2.1	Hospital Universitario La Ribera	95
4.2.1.1	Porcentaje de resistencia a meticilina	95
4.2.1.2	Resistencia antibiótica	96
4.2.2	Hospital Clínico Universitario de Valencia, Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy y Hospital General de Castellón	99
4.2.2.1	Porcentaje de resistencia a meticilina	99
4.3	Estudio de la producción de Leucocidina de Panton Valentine	100
4.4	Datos genotípicos	101
4.4.1	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)	101
4.4.1.1	Patrones PCR-RFLP obtenidos para la coagulasa	101
4.4.1.3	Patrones PCR obtenidos para el Clumping factor B	107

4.4.1.4 Combinación patrones PCR-RFLP obtenidos para la Coagulasa, la Proteína A y el Clumping factor B	109
4.4.2 Electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE)	115
4.4.3 Evaluación del poder de discriminación del PCR-RFLP (<i>coa-spa-clfB</i>) como método de tipado frente al PFGE	124
4.4.4 Utilidad del genotipado por PCR-RFLP en la detección de un brote de SARM en el Servicio de Medicina Intensiva	125
5. Discusión	127
5.1 Sobre la prevalencia de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	129
5.2 A propósito de la producción de Leucocidina de Pantón Valentine	131
5.3 Acerca de la utilidad de la PCR-RFLP (<i>coa, spa, clfB</i>) en el análisis epidemiológico	132
5.4 Análisis de la caracterización genotípica de los aislados	135
5.5 A propósito del brote declarado en el Servicio de Medicina Intensiva	138
6. Conclusiones	143
7. Bibliografía	147

Índice de figuras

Figura 1: Tinción de Gram (x100).	18
Figura 2: Hemólisis completa en una placa de agar sangre.	18
Figura 3: Fases de la patogenia de las infecciones y factores de virulencia involucrados.	21
Figura 4: Estructura de la pared celular estafilocócica.	23
Figura 5: Fases del desarrollo de la biocapa en los estafilococos.	25
Figura 6: Escisión e integración de SCCmec conteniendo el gen <i>mecA</i> .	36
Figura 7: Características de SCCmec tipo I-IV.	37
Figura 8: Test de inducción.	40
Figura 9: Distribución geográfica del porcentaje de bacteriemias por SARM-EARSS 2010.	43
Figura 10: Localidades a las que daba cobertura el Hospital Universitario de la Ribera.	68
Figura 11: Áreas de salud que participaron en el estudio.	70
Figura 12: Tipo de muestras remitidas desde el HCUV.	71
Figura 13: Tipo de muestras remitidas desde el HVLA.	72
Figura 14: Tipo de muestras remitidas desde el HGC.	72
Figura 15: Prueba de aglutinación en látex.	73
Figura 16: Identificación de <i>S. aureus</i> por el método de microdilución en caldo de Siemens.	73
Figura 17: Termociclador.	75
Figura 18: Cubeta de electroforesis.	76
Figura 19: Bandeja portageles.	79
Figura 20: Moldes empleados en la PFGE.	82
Figura 21: Chef-DR® III.	84
Figura 22: Diagrama de caja que refleja la edad media de la población.	91
Figura 23: Porcentaje de resistencia a meticilina.	96
Figura 24: Resultado de PCR del gen <i>mecA</i> .	96
Figura 25: Resultado de PCR del gen <i>Luk-PV</i> .	100
Figura 26: Amplificación por PCR del gen de la coagulasa.	101
Figura 27: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de coagulasa.	102
Figura 28: Patrones de electroforesis PCR-RFLP del gen de la coagulasa digerido con <i>Cfol</i> .	102
Figura 29: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de digestión de coagulasa.	104
Figura 30: Amplificación por PCR del gen de la proteína A.	104
Figura 31: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de proteína A.	105
Figura 32: Patrones de electroforesis PCR-RFLP de la proteína A digerido con <i>Cfol</i> .	105
Figura 33: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de digestión de proteína A.	107
Figura 34: Amplificación por PCR del gen del clumping factor B.	107

Índice

Figura 35: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de clumping factor B.	108
Figura 36: Genotipos con más de una cepa encontrados en los diferentes hospitales.	111
Figura 37: Dendograma de homología de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva.	114
Figura 38: Grado de similitud de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva.	115
Figura 39: Grado de similitud entre los patrones no únicos obtenidos con la enzima de restricción <i>SmaI</i>	118
Figura 40: Dendograma de los patrones no únicos obtenidos con la enzima de restricción <i>SmaI</i> tras análisis PFGE de las muestras procedentes de los cuatro hospitales.	119
Figura 41: Grado de similitud intra-subgrupo de homología.	120
Figura 42: Dendograma de homología de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva tras análisis PFGE.	122
Figura 43: Resultado del PFGE de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva.	123
Figura 44: Grado de similitud de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva.	123
Figura 45: Ejemplo de PFGE de un grupo de muestras del HCUV.	124
Figura 46: Dendogramas obtenidos para las muestras de Medicina Intensiva estudiadas por los dos métodos de tipado evaluados	126

Índice de tablas

Tabla 1: Mecanismos de resistencia a antimicrobianos identificados en <i>S. aureus</i> .	34
Tabla 2: Casos confirmados de VISA en Europa según el estudio EARSS 2008.	40
Tabla 3: Evolución del porcentaje de bacteriemias de SARM en España según el estudio EARSS 2010.	44
Tabla 4: Prevalencia de resistencia a antibióticos en España - EARSS 2010.	45
Tabla 5: Prevalencia de resistencia a antibióticos en aislamientos invasivos según servicio hospitalario en España - EARSS 2010.	45
Tabla 6: Origen de los aislados.	69
Tabla 7: Relación entre el tipo de muestra y servicio de procedencia de los aislados nosocomiales..	92
Tabla 8: Aislados de SASM. Tratamiento de elección en función del origen y el tipo de muestra.	94
Tabla 9: Aislados de SARM. Tratamiento de elección en función del origen y el tipo de muestra.	95

Tabla 10: Porcentaje de resistencia a los diferentes grupos de antibiótico testados en función de su origen.	97
Tabla 11: Fenotipos de resistencia de las cepas SASM.	98
Tabla 12: Fenotipos de resistencia de cepas SARM.	99
Tabla 13: Frecuencia de aparición de los patrones de digestión de la coagulasa.	103
Tabla 14: Frecuencia de aparición de los patrones de digestión de la proteína A en las cepas analizadas de los diferentes hospitales.	106
Tabla 15: Frecuencia de aparición de los patrones del clumping factor B.	108
Tabla 16: Genotipos del HUR en función de su origen.	110
Tabla 17: Grupos y subgrupos de homología de PCR-RFLP tras aplicar el coeficiente de Dice.	113
Tabla 18: Perfiles de PFGE del total de cepas tipadas. Número y tamaño de los fragmentos encontrados. Número de cepas incluidas en cada uno de los patrones.	116
Tabla 19: Número de aislados incluidos en cada subtipo.	121

1. Introducción

1.1. Microbiología de las infecciones por *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Descripción del género y características generales

La especie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) forma parte del género *Staphylococcus*, que se clasificaba dentro de la familia Micrococcaceae. Sin embargo, estudios recientes de homología genética, han demostrado que los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* en realidad están poco relacionados; por lo que el género *Staphylococcus* se ha incluido en la familia Staphylococcaceae, en el orden Bacillales, junto a los géneros *Gemella*, *Macrococcus* y *Salinicoccus* con los que comparte mayor similitud genética, de acuerdo con la clasificación de la LPNS (*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*) (Cueto and Pascual, 2009). El nombre del género fue designado por Ogston en 1882 (Ogston. 1882) y se compone actualmente de 42 especies, siendo *S. aureus* la más importante en patología infecciosa humana.

Orden Bacillales

Familia Staphylococcaceae

Género *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus

El genoma de *S. aureus* tiene un contenido guanina más citosina (G+C) de aproximadamente un 32%, está compuesto por un único cromosoma de cerca de 2.8 Mb que porta unos 2.500 genes; además en algunas cepas se ha encontrado ADN plasmídico. Están disponibles las secuencias completas de varias cepas de interés epidemiológico como la N315, Mu 50, MRSA 252, la MSSA 476 (Holden *et al.*, 2004) y la de una cepa conocida como Michigan, caracterizada por presentar resistencia a vancomicina (VRSA) (Kuroda *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo que tiende a agruparse en forma de racimos o tétradas (su denominación deriva de la palabra griega *staphylé*, que significa “racimo de uvas”) aunque también se encuentran aislados, en parejas y en cadenas cortas (fig.1). Estas bacterias tienen un tamaño de 0,5 a 1 μm de diámetro, son inmóviles, catalasa positivas y no forman esporas.

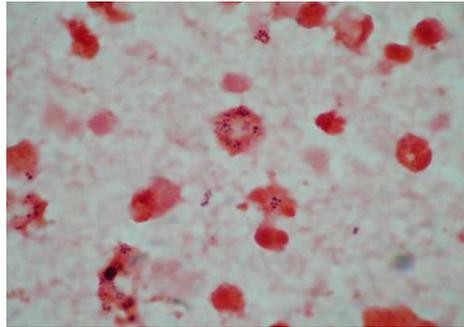


Figura 1: Tinción de Gram (x100).

Carecen de necesidades nutricionales especiales, por lo que se aíslan fácilmente en medios como el agar sangre, bajo condiciones aerobias o anaerobias. Son microorganismos mesófilos, con una temperatura de crecimiento óptima entre 35°C y 37°C. Resisten al calor y a la desecación y toleran concentraciones de hasta un 20% de NaCl, propiedad utilizada para crear condiciones selectivas en medios de cultivo. Tras 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias presentan un diámetro de 1 a 4mm; son convexas, lisas, brillantes, de consistencia cremosa y de color blanquecino, y tienden a pigmentarse de un color amarillo dorado. La mayor parte de las cepas son productoras de beta-hemólisis (fig. 2), mostrando un halo de hemólisis completa alrededor de la colonia cuando crecen en medios de cultivo con sangre.



Figura 2: Hemólisis completa en una placa de agar sangre.

Uno de los medios selectivos más utilizados para aislar *S. aureus* es el agar sal manitol (medio Chapman), que inhibe el crecimiento de bacterias gramnegativas ya que contiene una elevada concentración de sal. Actualmente se dispone de medios cromogénicos que facilitan una rápida identificación de *S. aureus* (Krishna *et al.*, 2008; Lagace-Wiens *et al.*, 2008), al tiempo que diferencian entre aislados resistentes o no a meticilina. La mayor parte de los laboratorios completan la identificación con sistemas automatizados, basados en la utilización de sustratos deshidratados, de esta forma pueden determinar diferentes especies de estafilococos.

1.1.2. Epidemiología

S. aureus es un patógeno oportunista que forma parte de la microflora humana normal, colonizando hasta un 40% de individuos sanos de manera permanente o transitoria. Aunque las fosas nasales son el sitio de colonización más habitual, existen otras zonas como piel, axila, vagina, perineo u orofaringe; que también actúan como reservorios y aumentan el riesgo de infección con respecto a individuos no colonizados. Es especialmente frecuente entre el personal sanitario, en personas diabéticas insulino dependientes, pacientes con enfermedades dermatológicas o en hemodiálisis y usuarios de drogas parenterales. Una persona puede adquirir la infección a partir de cepas endógenas, por transmisión interpersonal o por exposición al ambiente.

A lo largo de los años la epidemiología de las infecciones por *S. aureus* ha experimentado cambios clínicos y microbiológicos, especialmente relevantes en los aislados de *S. aureus* meticilin-resistentes (SARM). Las primeras cepas SARM detectadas eran nosocomiales, pero en la década de los noventa estas mismas cepas se encontraron en pacientes que habían adquirido la infección en la comunidad. Los tratamientos ambulatorios y los hospitales de día, favorecieron la diseminación en la comunidad de cepas SARM consideradas, hasta entonces, como hospitalarias. Las instituciones de pacientes crónicos y encamados, los centros de cuidados paliativos, la presencia de úlceras de decúbito y la hospitalización previa, se convirtieron en

los principales factores de riesgo para la adquisición de una cepa SARM (Bradley. 1999).

Actualmente, a las infecciones nosocomiales y comunitarias, se une una tercera categoría denominada “infecciones asociadas a cuidados sanitarios” (IACS); en la que se incluyen pacientes no hospitalizados que mantienen un estrecho contacto con el sistema sanitario y que son un grupo especialmente susceptible a la adquisición de infecciones por SARM.

En la última década se han descrito infecciones por SARM comunitario (SARM-CO), en las que los estudios moleculares han evidenciado un origen no relacionado con el hospital o con los cuidados sanitarios; sino que han evolucionado a partir de cepas de origen comunitario. Producen infecciones en pacientes que no presentan los factores de riesgo ya mencionados para la infección por SARM hospitalario, como la historia previa de infección o colonización por SARM, hospitalizaciones en el año previo, asistencia a centros socio-sanitarios o de diálisis, intervenciones quirúrgicas, implantación de catéteres u otros dispositivos médicos, o el ser familiares de trabajadores sanitarios (Cercenado and Ruiz de Gopegui, 2008). Las cepas SARM-CO son causa de infecciones de piel y partes blandas y de neumonía necrosante grave en niños y adultos jóvenes previamente sanos; y como factores de riesgo se apuntan la exposición con antimicrobianos previa y la transmisión a partir de animales de compañía o de granja (Cuevas *et al.*, 2008). Se caracterizan por presentar resistencia a meticilina y susceptibilidad al resto de antibióticos, con algunas excepciones (Broseta *et al.*, 2006). Poseen características que parecen conferir ventajas ecológicas selectivas, ya que presentan mayor velocidad de replicación y factores de virulencia como la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV), citotoxina codificada por un bacteriófago que produce destrucción de los leucocitos y la necrosis tisular responsable de los cuadros de neumonía necrotizante y las infecciones severas de piel y partes blandas.

Estudios epidemiológicos confirman que en Europa la prevalencia de SARM-CO es baja, en torno a un 1%, pero que se está incrementando. La

excepción la encontramos en Grecia que se acerca a los datos de Estados Unidos, donde hasta un 50% de los aislados de infecciones de piel y tejidos blandos pueden ser SARM-CO (Otter and French, 2010)(Navarro *et al.*, 2008). En España el SARM-CO es, por el momento, un problema muy poco frecuente, que fue descrito por primera vez en un estudio realizado con pacientes pediátricos en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, en el que se describe infección de partes blandas, otitis y bacteriemia con cepas únicamente resistentes a meticilina, portadoras del gen SSC *meclV* y de genes de la LPV (Broseta *et al.*, 2006).

1.1.3. Factores de virulencia bacteriana

La patogenia de las infecciones producidas por *S. aureus* es un fenómeno complejo, por los múltiples factores de virulencia que se expresan a lo largo de las fases en las que tiene lugar la infección (figura 3).

Fase	Factores de virulencia más relevantes	Infecciones asociadas
Adherencia bacteriana	Factor de agregación (<i>clumping factor</i>), proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina y sialoproteína ósea.	Endocarditis, infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares, osteomielitis, artritis.
Persistencia bacteriana	Formación de biocapas (polisacárido de adhesión intracelular), variantes de colonias pequeñas y persistencia intracelular.	Infecciones recurrentes, fibrosis quística y todas las anteriores.
Evasión de los mecanismos de defensa del huésped	Cápsula polisacárida, proteína A, proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIP), proteína de adherencia extracelular (Eap), citotoxinas (Leucocidina de Pantón Valentine y α -toxina).	Infecciones cutáneas invasivas, neumonía necrotizante, abscesos.
Penetración e invasión tisular	Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronidasas, fosfolipasa C y elastasas.	Destrucción tisular e infecciones metastásicas.
Shock séptico y cuadros tóxicos	Enterotoxinas, toxina del síndrome del shock tóxico 1, toxinas exfoliativas A y B, α -toxina, peptidoglicano y ácidos teicoicos.	Toxiinfecciones alimentarias, síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada, impétigo bulloso y sepsis.

Figura 3: Fases de la patogenia de las infecciones por *S. aureus* y factores de virulencia involucrados (Cueto and Pascual, 2009).

1.1.3.1. Componentes de la pared celular

Como en la mayoría de las bacterias grampositivas, los componentes fundamentales de la pared celular son el peptidoglicano y los ácidos teicoicos

(figura 4). El peptidoglicano representa el 50% de la pared celular y proporciona forma y estabilidad al microorganismo; además tiene actividad endotóxica, por lo que interviene de forma importante en la patogenia de la infección. Es un polímero compuesto por subunidades alternantes de N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces β . Entre sus propiedades biológicas destacan su capacidad para inducir la producción de interleucina-1 (IL-1) en los monocitos humanos y una reacción local capaz de atraer a leucocitos polimorfonucleares, activar el complemento y estimular la producción de anticuerpos opsonizantes.

El otro componente fundamental de la pared son los ácidos teicoicos, que suponen alrededor del 40% del peso. Destacan los ácidos formados por secuencias alternantes de ribitol-fosfato que se unen covalentemente al peptidoglicano, y los de unidades repetidas de glicerol-fosfato unidos a la membrana citoplasmática. La principal función de los ácidos teicoicos es mediar en la unión de *S. aureus* a las superficies mucosas a través de las fibronectinas (Smith *et al.*, 2012) (Bannerman, 2007).

Embebida en la capa externa del peptidoglicano se encuentra la proteína A, específica de *S. aureus*; utilizada en su identificación mediante pruebas de aglutinación con anticuerpos monoclonales (Bannerman, 2007). Su reacción con los mecanismos del hospedador, consiste en activar el complemento y enlazarse con la porción Fc de todas las inmunoglobulinas IgG, excepto la IgG₃; previniendo la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos al inhibir la opsonización y la fagocitosis (Espersen. 1985).

Entre las adhesinas asociadas a la pared celular están las proteínas de unión a la fibronectina, el factor de agregación (clumping factor o coagulasa ligada a la célula) y las proteínas de unión al colágeno. Muchas cepas están recubiertas por una capa externa de polisacáridos o cápsula, que facilita la adherencia de las bacterias y posee capacidad antifagocitaria (Waldvogel *et al.*, 2011).

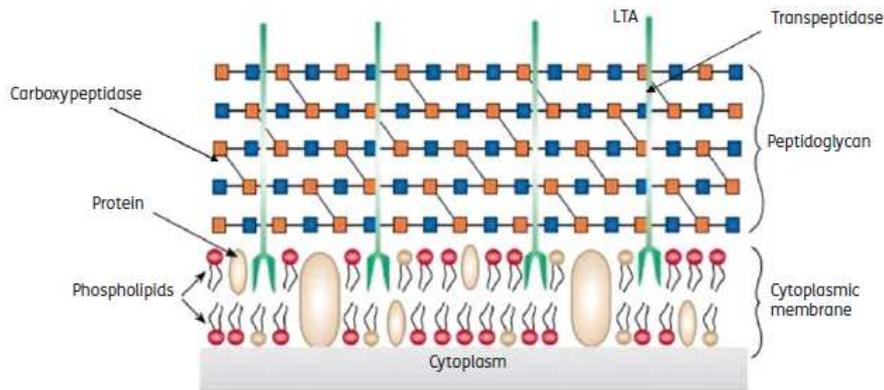


Figura 4: Estructura de la pared celular estafilocócica. LTA: Ácido lipoteicoico (Sykes. 2010).

1.1.3.2. Enzimas estafilocócicas

Son sustancias que producen su acción en zonas próximas al foco infeccioso y algunas de ellas se han utilizado en medios de cultivo y en el diseño de esquemas de identificación, por su carácter diferencial. Podemos destacar la actividad enzimática de la coagulasa, que puede presentarse libre o ligada y que interviene en la formación de coágulos al convertir el fibrinógeno en fibrina, facilitando procesos sépticos y la formación de abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa (Bannerman, 2007). La coagulasa libre, o clumping factor B se ha propuesto como uno de los factores determinantes de la colonización nasal, favoreciendo la unión al epitelio uniéndose a la citocina 10 humana tipo I que se expresa en las células epiteliales escamosas (Wertheim *et al.*, 2008). También se ha relacionado con procesos de endocarditis en válvula nativa, siendo el principal responsable de la endocarditis infecciosa en adictos a drogas por vía parenteral (Koreen *et al.*, 2005).

Otras enzimas producidas por *S. aureus* son la catalasa, que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, protegiendo al microorganismo durante la fagocitosis; la hialuronidasa que hidroliza los ácidos hialurónicos de la matriz acelular del tejido conectivo, favoreciendo la diseminación de *S. aureus* en los tejidos; las lipasas que garantizan la supervivencia de los estafilococos en las zonas sebáceas del organismo; o la

penicilinas producidas en la actualidad por casi todas las cepas de *S. aureus*; que inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo beta-lactámico.

1.1.3.3. Toxinas estafilocócicas

Son proteínas extracelulares que producen su acción en zonas distantes del foco infeccioso, destacando cinco toxinas citolíticas (alfa, beta, gamma, delta y LPV), dos toxinas exfoliativas (A y B), ocho enterotoxinas (A, B, C, D, E, G, H, I) y la toxina 1 del síndrome del *shock* tóxico (TSST-1). Se han desarrollado técnicas de multiplex PCR en tiempo real, para la detección simultánea de genes asociados a toxinas, LPV y la presencia del gen *mecA* (Fosheim *et al.*, 2011).

La toxina alfa, secretada por casi todas las cepas de *S. aureus*, interviene en el desarrollo de edema y daño tisular al lisar las membranas celulares mediante inserción directa en la bicapa lipídica, para formar poros transmembranales, provocando la muerte celular.

Cabe destacar el exoenzima conocido como leucocidina de Panton-Valentine (LPV) compuesto por dos subunidades proteicas (F y S) sintetizadas independientemente, que actúan de forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocíticas. Se une a los fosfolípidos de las membranas de los leucocitos y macrófagos induciendo la formación de poros que alteran la permeabilidad celular destruyendo la célula.

Las toxinas exfoliativas son responsables del síndrome de la piel escaldada al destruir los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis. Mientras que las enterotoxinas resistentes a los enzimas digestivos, producen intoxicaciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis. Por último, la toxina del síndrome del *shock* tóxico (TSST-1), una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos que actúa como un superantígeno estimulando la liberación de citocinas y provocando extravasación de células endoteliales.

1.1.3.4. Formación de biocapas

Muchas formas de infecciones estafilocócicas están asociadas con la formación de comunidades de bacterias organizadas, tanto física como funcionalmente, en una matriz hidratada de sustancias poliméricas extracelulares denominadas biocapas, depositadas sobre superficies tisulares o protésicas. Las bacterias que forman parte de la biocapa presentan un comportamiento coordinado estableciéndose una heterogeneidad fenotípica entre los distintos miembros para determinadas acciones como la expresión de moléculas de superficie, resistencia a antibióticos, utilización de nutrientes o síntesis de factores de virulencia (Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). La constitución de biocapas bacterianas protege a *S. aureus* de la actividad de los mecanismos de defensa del huésped y de los antimicrobianos y explica, en parte, la dificultad de erradicar infecciones asociadas a dispositivos protésicos sin la retirada de los mismos. Además parece tener la capacidad de sobrevivir intracelularmente, incluso en células endoteliales, lo que contribuye a la evasión de los sistemas defensivos en casos de endocarditis (Cueto and Pascual, 2009).

El estudio del desarrollo de biocapas en diferentes organismos ha llevado a diferenciar el proceso en varias etapas que implican una adhesión inicial, una fase de maduración posterior y una fase de dispersión; procesos esquematizados en la figura 5.

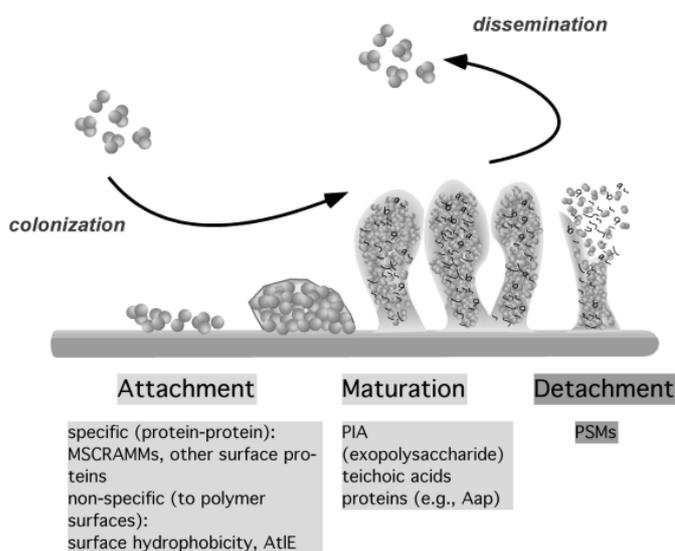


Figura 5: Fases del desarrollo de la biocapa en los estafilococos (Otto, 2008).
 MSCRAMM: *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*;
 PIA: *polysaccharide intercellular adhesin*; PSM: *Phenol-soluble modulins*.

El primer paso para la formación de la biocapa requiere la adhesión inicial a las células del hospedador, para ello, *S. aureus* posee proteínas de superficie que median la adherencia a los tejidos del hospedador que se conocen como componentes microbianos de superficie que se adhieren a las moléculas tisulares (MSCRAMM: *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Estas proteínas presentan la capacidad de unirse a proteínas de la matriz humana como el fibrinógeno, la fibronectina y el colágeno. Los MSCRAMM se producen principalmente en bacterias en fase de crecimiento logarítmico favoreciendo la colonización de superficies (Gordon and Lowy, 2008).

La fase de maduración se inicia con la agregación intercelular en la que el polisacárido de adhesión intracelular (PIA: *polysaccharide intercellular adhesin*) mediado por un gen denominado *ica*; junto a otros polímeros como ácidos teicoicos y proteínas; son la base principal de la matriz extracelular de la biocapa funcionando como un pegamento de unión a las células. Las células se agregan en estructuras tridimensionales en forma de torres, por el centro de las cuales discurren canales encargados del transporte de nutrientes, desde la superficie hacia las capas más profundas de la biocapa. Además existen sistemas de comunicación célula-célula conocidos como *quorum sensing* (QS). El QS está mediado por pequeñas proteínas producidas por las bacterias que se denominan autoinductores y que, dependiendo de factores ambientales, activan un gran número de genes, incluidos factores de virulencia. El sistema QS más estudiado en *S. aureus* se denomina “regulador de genes accesorios” o *agr*, e interviene principalmente en la formación de la biocapa (Cueto and Pascual, 2009). Este sistema QS también es responsable de regular el desprendimiento de la biopelícula, en forma de células individuales o por grupos de células; proceso crucial para la difusión de las bacterias a otros lugares de colonización (Otto. 2008). Entre los factores que contribuyen a la separación se encuentran fuerzas mecánicas como el flujo sanguíneo, el cese de la producción de materiales de construcción de la biocapa, como los exopolisacáridos, y la síntesis de enzimas que destruyen la matriz.

1.1.3.5. Leucocidina de Panton Valentine (LPV)

La LPV se encuentra en menos del 5% de los aislados de *S. aureus* y se ha detectado en la mayoría de los SARM-CO estudiadas, excepto en la mayor parte de los aislados comunitarios descritos en Australia, que no la poseen (Deresinski. 2005). Por tanto, aunque la presencia de LPV es en general un marcador de SARM-CO, ésta no es una característica estrictamente necesaria, ya que algunos clones comunitarios no la presentan (Cuevas *et al.*, 2008).

Está codificada por los genes *lukF-PV* y *lukS-PV*, los cuales se transfieren de una cepa a otra a través de bacteriófagos y se insertan en un lugar específico del cromosoma, distinto del lugar de inserción del *SCCmec*. Hasta el momento la LPV sólo se ha asociado con el *SCCmec* tipo IV y en menor frecuencia con el tipo V.

Induce la liberación de enzimas inflamatorios y citocinas en polimorfonucleares, células sobre las que también puede inducir apoptosis y necrosis en altas concentraciones. Parece jugar un papel importante en las infecciones de piel y partes blandas, neumonía necrosante e infecciones de huesos y articulaciones (Gordon and Lowy, 2008), lo que evidenciaría que el alto potencial de virulencia de las cepas SARM-CO se origina por la presencia de la LPV (Vandenesch *et al.*, 2003). Sin embargo, en este sentido los estudios en los que se compara la virulencia de cepas productoras y no productoras de LPV, muestran resultados contradictorios. Algunos autores consideran que LPV no constituye un factor esencial en la virulencia de estas cepas, ya que al estudiar en un modelo murino las cepas USA300 y USA400 de tipo salvaje, y una vez eliminado el gen de la LPV, la infección presentaba idéntico curso (Voyich *et al.*, 2006). Otros autores consideran que la LPV es sólo relevante en infecciones como la neumonía necrotizante (Genestier *et al.*, 2005); mientras que otros relacionan la patogenia con los niveles de toxina producida, ya que al comparar, en modelo murino, cepas con un alto nivel de expresión de LPV con cepas productoras de bajos niveles, las primeras causaban grandes abscesos en la piel (Varshney *et al.*, 2010). Una posible explicación a la obtención de

estos datos contradictorios la ofrecen Löffler y colaboradores quienes demuestran que la LPV actúa de forma distinta sobre los neutrófilos en diferentes especies, induciendo muerte celular en humanos o conejos pero no en ratones, lo que pondría en duda la extrapolación de los resultados obtenidos en modelo murino que no sería un modelo válido para estos estudios (Löffler *et al.*, 2010).

1.2. Manifestaciones clínicas

S. aureus es una de las principales causas de infección en el hombre, responsable de infecciones de piel y partes blandas de carácter supurativo, con tendencia a la formación de abscesos. Muchas de estas infecciones, aunque inicialmente localizadas, pueden diseminarse y ser origen de bacteriemias, endocarditis, infecciones intravasculares o neumonía; además de producir un elevado número de infecciones relacionadas con la utilización de catéteres, prótesis y otros dispositivos médicos (Klevens *et al.*, 2006).

Las toxinas estafilocócicas, como ya hemos visto, pueden producir distintos cuadros, entre los que se encuentran el Síndrome de la piel escaldada estafilocócica, que corresponde con una dermatitis exfoliativa ampollar, consecuencia de la producción de dos toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y que afecta especialmente a recién nacidos y niños; el Síndrome del shock tóxico que se trata de un cuadro grave debido a la producción de TSS-1, inicialmente descrito en niños y posteriormente en mujeres jóvenes que usaban tampones; se caracteriza por fiebre elevada, vómitos, diarrea, faringitis y dolor muscular; que puede progresar, en tan solo 48 horas, en un shock séptico con manifestaciones de lesión renal y hepática. Las toxiinfecciones alimentarias o gastroenteritis tóxicas estafilocócicas, se deben a la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxina estafilocócica, productora de un cuadro afebril autolimitado que cursa con vómitos, dolor cólico y diarrea a las pocas horas de la ingestión.

Las infecciones cutáneas suelen iniciarse a partir de una lesión en la piel (heridas traumáticas, úlceras de presión, adicción a drogas por vía parenteral, catéteres endovenosos) aunque existen otros factores que predisponen como la diabetes mellitus, vasculopatías, enfermedades neurológicas, alteraciones en el drenaje linfático, enfermedades cutáneas e inmunosupresión. *S. aureus* es uno de los patógenos más frecuentes en infecciones de heridas quirúrgicas superficiales y profundas, al tratarse de un colonizador habitual de la piel, siendo la lesión más común la formación de exudado purulento o absceso (Domínguez, 2006).

En el caso de SARM adquirido en la comunidad, la mayoría de las infecciones que produce afectan a la piel y tejidos blandos produciendo principalmente forunculosis que se asocia con la presencia de LPV (Cercenado, 2011).

S. aureus es la primera causa de bacteriemia nosocomial en Europa. Las bacteriemias producidas en el hospital y las asociadas a cuidados sanitarios suelen relacionarse con accesos vasculares y bacterias procedentes del tracto digestivo; mientras que las comunitarias, pese a ser menos frecuentes, en ocasiones se relacionan con un mayor riesgo de complicaciones y mortalidad (Kaech *et al.*, 2006). Alrededor de un tercio de los pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, desarrollan complicaciones locales o metastásicas, destacando por su gravedad la endocarditis y la pericarditis.

Aunque las infecciones respiratorias nosocomiales pueden deberse a diversas etiologías, *S. aureus* se encuentra entre las tres más frecuentes, siendo la mitad de los aislamientos resistentes a meticilina. Los principales factores de riesgo de adquisición de neumonía nosocomial por SARM son la presencia de EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), el uso de corticoides, antibioterapia previa o, más frecuentemente, pacientes sometidos a ventilación mecánica prolongada. Por otro lado la neumonía es, junto a la infección de piel y partes blandas, otra de las manifestaciones características de SARM comunitario productor de LPV y afecta tanto a adultos como a

individuos jóvenes debido, frecuentemente, a complicación de cuadros víricos gripales, aunque a diferencia de la nosocomial, suele progresar rápidamente. Un estudio reciente parece demostrar en modelo murino, que la coinfección de clones de SARM como el USA300, incrementan su capacidad patogénica durante la coinfección con el virus Influenza (Iverson *et al.*, 2011).

S. aureus es el principal agente etiológico de la osteomielitis, propiciado por la gran variedad de factores de virulencia que le permiten adherirse, evadir la respuesta del hospedador y degradar la matriz del hueso. En los niños afecta habitualmente a las metáfisis de los huesos largos; mientras que en los adultos suele afectar al tejido esponjoso vertebral. Respecto a la infección de prótesis articulares, *S. aureus* se adhiere gracias a los MSCRAMM, descritos anteriormente, para formar biopelículas produciéndose manifestaciones clínicas derivadas de la respuesta inmune local (Arciola *et al.*, 2011).

Por último, *S. aureus* puede ser responsable de meningitis asociadas a enfermedades cardiovasculares, inmunodeficiencias o edad avanzada. Un estudio reciente apunta la prematuridad como factor de riesgo de bacteriemia y meningitis por *S. aureus* (Shane *et al.*, 2012). Sus características clínicas no difieren de otras meningitis bacterianas, excepto en que con frecuencia viene asociada a otras complicaciones como la endocarditis (Ceccarelli *et al.*, 2011).

1.3. Tratamiento de las infecciones

En el grupo terapéutico de los β -lactámicos, se encuentran los estafilocócicos más eficaces frente a los *S. aureus* meticilin-sensibles (SASM), especialmente la cloxacilina, pero también cefalosporinas de primera generación, como cefazolina, que presentan una excelente actividad y pueden constituir una alternativa en caso de alergia no grave a la penicilina. La amoxicilina-clavulánico, que incorpora un inhibidor de las β -lactamasas bacterianas, o los carbapenemes en infecciones graves, son algunos de los tratamientos de elección (Germel *et al.*, 2012). La vancomicina tiene una

eficacia clínica inferior a la cloxacilina en infecciones graves producidas por SARM, por ello debe reservarse para situaciones concretas.

En los últimos años se han desarrollado cefalosporinas como el ceftobiprol o la ceftarolina capaces de unirse a la proteína mutada PBP2a, por lo que resultan eficaces en el tratamiento de aislados SARM (Bazan *et al.*, 2011).

La emergencia de *S. aureus* resistentes a meticilina, desde 1961, ha complicado el tratamiento de estas infecciones en las que los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) son, en algunos casos, la única alternativa terapéutica. En los últimos años se han desarrollado antibióticos como el linezolid y la daptomicina, si bien la ausencia de datos concluyentes que demuestren una clara superioridad de estos fármacos sobre la vancomicina, unido al hecho de que incrementan el coste de forma considerable, mantiene a los glicopéptidos como tratamiento de elección cuando se sospecha una infección por SARM. En los últimos años se han recogido diversos estudios que sostienen la necesidad de conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de vancomicina en el tratamiento de las bacteriemias, ya que CMI > 1 µg/mL para este fármaco, parecen asociarse con fracaso terapéutico (Soriano *et al.*, 2008). Un estudio comparativo entre cepas de SARM procedentes de España, Bélgica y Reino Unido, plantea además la necesidad de conocer las CMI locales para la instauración de tratamientos empíricos correctos, ya que encuentran diferencias notables en las CMI frente a daptomicina, linezolid y tigeciclina en función del área de procedencia del aislado (Canut *et al.*, 2012).

La gran variedad de procesos que puede producir *S. aureus*, requiere individualizar el tratamiento en función de la localización de la infección. De acuerdo con los datos publicados por el IDSA (Liu *et al.*, 2011), en el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos producidos por SARM estaría indicado el empleo de mupirocina al 2%. En los abscesos cutáneos cotrimoxazol, doxiciclina o clindamicina; reservando para infecciones

complicadas que requieren ingreso hospitalario: vancomicina, linezolid, daptomicina, telavancina o clindamicina por vía intravenosa.

En las bacteriemias y endocarditis de válvula nativa, se recomienda vancomicina o daptomicina durante 2 semanas en infección no complicada, que se prolongaría a 4-6 semanas si se dan complicaciones. Las endocarditis de prótesis valvulares requieren gentamicina durante las 2 primeras semanas, a las que se añade la combinación de vancomicina y rifampicina, que se mantienen durante 6 semanas.

Las infecciones óseas y articulares requieren el desbridamiento y drenaje de los abscesos asociados, junto con tratamiento antibiótico por vía parenteral (vancomicina o daptomicina), oral (cotrimoxazol + rifampicina, linezolid o clindamicina) o la combinación de ambas, en función de las características del paciente.

La recomendación para las neumonías comunitarias severas que presentan infiltrados necrotizantes, cavitarios o empiemas y que requieren ingresos en Medicina Intensiva, utilizan como tratamiento empírico vancomicina, linezolid o clindamicina durante 1-3 semanas, en estos casos la daptomicina no es eficaz, ya que se inactiva con el surfactante pulmonar.

Las infecciones del sistema nervioso central, como la meningitis, se tratan con vancomicina asociada o no a rifampicina durante 2 semanas, aunque como alternativas se puede utilizar linezolid o cotrimoxazol; y en el caso de absceso cerebral, espinal, epidural o empiema subdural se emplean los mismos fármacos durante 4-6 semanas y se debe hacer una evaluación neuroquirúrgica para proceder a su incisión y drenaje.

1.4. Mecanismos de resistencia

Las bacterias se multiplican asexualmente por división binaria produciéndose clones unas de otras, por tanto, cualquier variabilidad genética, como la adquisición de resistencia a los antibióticos, requiere de mutaciones

aleatorias del genoma (resistencia cromosómica) o de transferencia horizontal de material genético (resistencia extracromosómica). Esta transferencia puede producirse por transducción o por transformación, cuando el intercambio genético se produce entre bacterias de la misma especie o de especies genéticamente muy próximas, y por conjugación cuando se intercambian genes entre diferentes especies, a través de transposones (secuencias móviles de ADN) y plásmidos conjugativos (ADN circular de doble cadena capaz de replicarse de forma independiente). Así la capacidad de adaptación bacteriana a nuevos ambientes es, a menudo, resultado de la adquisición de genes a través de transferencia horizontal (Sykes. 2010).

El estudio de la sensibilidad antimicrobiana resulta útil para el tratamiento de un paciente; pero no debemos olvidar la importancia de controlar la diseminación de organismos multirresistentes o de genes de resistencia, tanto a nivel nosocomial como comunitario. La extensiva aplicación de los antibióticos ha tenido como consecuencia la selección natural de cepas resistentes a las moléculas en uso.

1.4.1. Evolución de la resistencia a los antimicrobianos

Sólo cuatro años después del descubrimiento y la aplicación en terapéutica de las primeras penicilinas en 1940, hasta un 60% de las cepas de *S. aureus* habían adquirido resistencia a estas moléculas debido a que rápidamente desarrollaron la capacidad de producir β -lactamasas (Cameron *et al.*, 2011). Durante la década de 1950 se fueron introduciendo nuevos antibióticos en la práctica clínica (tetraciclina, estreptomina, cloranfenicol, eritromicina), notificándose los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multirresistentes en 1957, y a principios de 1960 los estafilococos habían adquirido resistencia a la gran mayoría de los antibióticos disponibles. El mismo año de la introducción, en 1961, de las penicilinas semisintéticas (metilina, oxacilina, dicloxacilina) que resisten la acción de las β -lactamasas, aparecieron las primeras resistencias mediadas por adquisición del gen *mecA* (Rodríguez-Baño *et al.*, 2006).

La aparición de cepas de SARM obligó a aumentar el consumo del glicopéptido Vancomicina, del que no se describió una disminución de su susceptibilidad hasta 40 años después de su autorización, en 1958. En 1997, se describe en Japón el primer aislado de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a la vancomicina (VISA) (Hiramatsu *et al.*, 1997); aunque hasta el 2002 no se describen cepas de SARM con resistencia de alto nivel (VRSA) en las que se demuestra su transferencia plasmídica *in vivo*. A pesar de que son raros los aislamientos de VRSA, la prevalencia de VISA y la de cepas con resistencia heterogénea a este antimicrobiano (hVISA) han seguido aumentando (Cameron *et al.*, 2011).

La efectividad a otras clases de antibióticos como macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y quinolonas también se ha visto disminuida. Aunque de forma esporádica, también se ha comunicado la existencia de cepas resistentes a fármacos de más reciente introducción, como la daptomicina o el linezolid (Sivakumar *et al.*, 2012)(Ikeda-Dantsuji *et al.*, 2012), por lo que encontrar el tratamiento adecuado puede suponer un reto.

Queda patente el hecho de que la resistencia de *S. aureus* a los antimicrobianos es un proceso complejo, en constante evolución.

1.4.2. Mecanismo de resistencia en *S. aureus*

De forma general los mecanismos de resistencia antibiótica más importantes en la especie *S. aureus* son:

Mecanismo de resistencia	Antibióticos afectados
Modificación / Inactivación enzimática	β -lactámicos Aminoglucósidos
Modificación de la diana	Meticilina Macrólidos Vancomicina
Secuestro del antibiótico	Vancomicina Daptomicina
Bombas de expulsión	Fluorquinolonas Tetraciclinas

Tabla 1: Mecanismos de resistencia a antimicrobianos identificados en *S. aureus* (Sykes. 2010).

1.4.2.1. Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos

Los β -lactámicos son los antibacterianos más utilizados, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario, debido a su actividad bactericida, eficacia, escasa toxicidad y amplio margen terapéutico. Actúan como análogos del dipéptido D-ala-D-ala e inhiben la síntesis del peptidoglicano impidiendo la reacción de transpeptidación, debilitando la estructura de la pared celular provocando su rotura y, por tanto, la muerte celular. Para ello deben llegar a su diana de actuación, las PBPs o proteínas fijadoras de penicilinas, situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática.

Uno de los principales mecanismos de resistencia a este grupo de fármacos en *S. aureus*, es la inactivación enzimática mediada por β -lactamasas. Estas enzimas hidrolizan el anillo lactámico haciendo al fármaco inactivo, ya que con esta estructura no es reconocido por las enzimas involucradas en la síntesis de la pared celular. El gen responsable se transfiere por transducción y produce una penicilinasa plasmídica inducible, que sólo se produce en presencia del fármaco. El número de copias de plásmido puede ser muy elevado, por lo que se sintetizan grandes cantidades de enzima que llegan al medio extracelular inactivando la penicilina antes de que llegue a su lugar de acción. Esta resistencia afecta a las penicilinas naturales y semisintéticas, pero no al resto de los β -lactámicos. Esta penicilinasa es inactivada por los inhibidores de β -lactamasas como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam; para los cuales, hasta la fecha, no se han documentado resistencias.

Al contrario de lo ocurrido con las penicilinas, la aparición de la resistencia a meticilina se desarrolló de forma más lenta, ya que en esta última no se produce inactivación enzimática o disminución de la permeabilidad. La resistencia a meticilina se debe a la presencia del gen *mecA*, que codifica la síntesis de una nueva proteína fijadora de penicilina, la PBP2a, que presenta una disminución en la afinidad por los antibióticos β -lactámicos. Las PBPs son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular. Las cepas de SARM, además de producir las cuatro PBPs características de

las cepas de estafilococos (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4), desarrollan la PBP2a, la cual sigue activa manteniendo la síntesis de la pared celular cuando las otras PBPs están inhibidas por la presencia de meticilina. Esta PBP2a confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, (incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas), excepto a las cefalosporinas anti-SARM denominadas ceftobiprol y ceftarolina, que presentan una gran afinidad por la PBP2a (Chung *et al.*, 2008).

El gen *mecA* forma parte de un elemento genético móvil denominado cassette cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) que se integra en un único sitio del cromosoma bacteriano, en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta *orfX*, localizado cerca del origen de replicación. SCC*mec* también contiene los genes reguladores *mecI* (que codifica una proteína de represión transcripcional MecI) y *mecR1* (que codifica una proteína de transducción de señales MecR1); así como las recombinasas necesarias para su integración y escisión (figura 6).

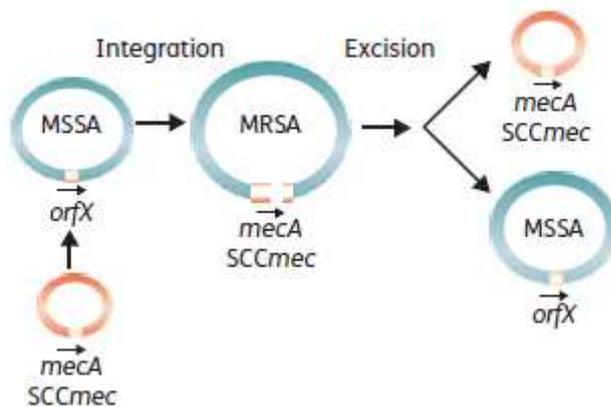


Figura 6: Escisión e integración de SCC*mec* conteniendo el gen *mecA* (Sykes. 2010) .

La expresión de PBP2a es inducida por la unión del β -lactámico al receptor de unión de la penicilina de la membrana citoplasmática, codificado por el gen *mecR1*, desencadenando una señal que conduce a la liberación proteolítica del represor *mecI* quedando libre la región operadora del *mecA* (Hiramatsu *et al.*, 2001). La secuenciación de SCC*mec* de los SARM ha permitido identificar cinco subtipos diferentes (I-V) con diferentes tamaños moleculares que varían de 20 a 68Kb, siendo los SCC*mec* tipo IV y V los más

pequeños (figura 7). La mayoría de los clones de SARM nosocomiales presentan el SCCmec I, II o III y suelen contener, además del gen *mecA*, otros genes que codifican la resistencia a múltiples antibióticos no β -lactámicos; lo que conduce al fenómeno de multirresistencia característico de las cepas nosocomiales (Cercenado and Ruiz de Gopegui, 2008). Por el contrario, las cepas de SARM adquiridas en la comunidad presentan los subtipos IV y V, los cuales carecen de los genes de multirresistencia a antibióticos, confiriéndoles la resistencia característica a meticilina y otros β -lactámicos, pero conservando la sensibilidad a fluorquinolonas, clindamicina o cotrimoxazol (Naimi *et al.*, 2003). Según un estudio multicéntrico realizado en 2002 en el que han intervenido 143 hospitales españoles, el SCCmec tipo IV es el más frecuente entre los aislados de SARM nosocomiales y el único tipo descrito en las cepas comunitarias (Cuevas *et al.*, 2007).

SCCmec type	SCCmec size, kb	Other antibiotic-resistant elements (gene) on SCCmec	Origin of <i>S. aureus</i> isolates carrying the specified SCCmec type	Presence of Panton-Valentine leukocidin in <i>S. aureus</i> isolates carrying the specified SCCmec type ^a
I	34	...	Hospital	Infrequent
II	53	PUB110 (<i>aadD</i>) ^b , Tn554 (<i>ermA</i>) ^c	Hospital	Infrequent
III	67	PUB110 (<i>aadD</i>) ^b , PT181 (<i>tetK</i>) ^d	Hospital	Infrequent
IV	21–24	...	Community	Frequent
V	28	...	Community	Unknown

^a In general, <5% of *S. aureus* strains that carry SCCmec types I–III also carry the PVL gene; with some exceptions, 40%–90% of *S. aureus* strains that carry SCCmec type IV carry the PVL gene.

^b Encodes resistance to tobramycin and kanamycin.

^c Encodes resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics.

^d Encodes resistance to tetracycline.

Figura 7: Características de SCCmec tipo I-IV (Deresinski. 2005).

Se han descrito otras modalidades de resistencia a la meticilina asociadas a concentraciones mínimas inhibitorias de meticilina mayores a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las cepas *borderline* (BORSA): son aquellas con resistencia de bajo nivel a la oxacilina, es decir, presentan una resistencia intermedia a la oxacilina con una CMI para este antibiótico en el punto de corte de resistencia o una dilución por encima de ésta (4-8mg/L). Las BORSA se pueden dividir en dos categorías en función de si presentan o no el gen *mecA*: si lo contienen son

cepas extremadamente heterorresistentes que producen la PBP2a; por el contrario si no contienen el gen *mecA*, esta resistencia de bajo nivel puede deberse a la hiperproducción de β -lactamasas estafilocócicas o a la modificación (hiperproducción o alteración) de las PBPs 1, 2, ó 4 de *S. aureus*. Las cepas hiperproductoras son sensibles a las asociaciones de β -lactámico con inhibidor de β -lactamasa. Las cepas *borderline mecA* negativas son sensibles a cefoxitina, mientras que las *mecA* positivas son resistentes a este antibiótico; por ello se emplea el disco de cefoxitina o la detección del gen *mecA* para diferenciar ambos tipos de BORSA (Domínguez, 2009). Las cepas de resistencia modificada (MODSA) presentan PBPs modificadas (PBP1 y PBP2, de baja afinidad) o hiperproducidas (PBP4) y no presentan el gen *mecA*, ni producen la PBP2a. Aunque no está determinada la frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia, se puede dar la posibilidad de que en una misma cepa de SARM coexistan distintos mecanismos (Chambers *et al.*, 1989).

Para el estudio de la sensibilidad a la metilina en el laboratorio, los sistemas que contienen oxacilina ofrecen buenos niveles de sensibilidad y especificidad, sin embargo en cepas con una expresión heterogénea de la resistencia, la capacidad de estos sistemas puede disminuir. Por tanto, se debe confirmar la resistencia en aislamientos obtenidos de hemocultivos o líquidos estériles, ante la sospecha de fallo terapéutico o cuando se aíslan cepas con resistencias asociadas a otros grupos de antibióticos. Para la confirmación de la resistencia a metilina mediante el método de disco-difusión el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomienda utilizar el disco de cefoxitina (30 μ g). La cefoxitina es un potente inductor de la producción de PBP2a, lo que hace que sea más precoz que la oxacilina en la detección de resistencias. La presencia de un halo de inhibición a cefoxitina inferior o igual a 21mm en *S. aureus* significa que la cepa en estudio es SARM (CLSI, 2010). Con independencia de estos métodos fenotípicos, el método que se considera de referencia es la detección del gen *mecA* por PCR convencional o a tiempo real (Batista *et al.*, 2008).

1.4.2.2. Mecanismo de resistencia a gluco y lipopéptidos

La vancomicina es un gluco péptido, producido por *Streptomyces orientales*, inhibidor de la síntesis del peptidoglicano en un paso anterior al de los β -lactámicos, ya que evita el proceso de polimerización necesario para que el complejo disacárido-pentapéptido se separe del fosfolípido de la membrana y además altera la permeabilidad de la membrana e inhibe la síntesis de ARN.

Hasta hace algunos años, los aislados de *S. aureus* eran sensibles a la vancomicina y la teicoplanina, sin embargo en 1977 se describió en Japón la existencia de aislados con sensibilidad disminuida a la vancomicina (Hiramatsu *et al.*, 1997). Estos aislados se denominaron VISA (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*) y pueden presentar dos tipos de expresión de la resistencia a gluco péptidos; homogénea (CMI vancomicina 8-16 mg/L) o heterogénea (CMI vancomicina 1-4 mg/L). Estas últimas denominadas hetero-VISA son más frecuentes y se caracterizan por presentar subpoblaciones con capacidad de crecer en concentraciones de 4-8mg/L de vancomicina. La resistencia se debe al engrosamiento de la pared por alteración de la estructura del peptidoglicano, impidiendo la unión del gluco péptido a los residuos de D-alanina-D-alanina para inhibir el entrecruzamiento esencial para la estabilidad de la pared celular.

Desde la aparición de cepas SARM con resistencia de alto nivel a los glicopéptidos (VRSA) (Tenover *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2008) debido a la adquisición del gen *vanA*, preocupa la posible diseminación de estos genes de resistencia, ya que se limitaría una de las opciones terapéuticas más importantes para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos.

En nuestro país, hasta el momento, no se ha declarado ninguna cepa considerada resistente a vancomicina. A través del EARSS se han notificado casos de cepas VISA, en concreto durante el 2008, 11 casos confirmados de entre las 31.819 cepas de *S. aureus* estudiadas (ocho casos en Austria, 2 casos en Hungría y 1 en Inglaterra) y 2 casos de VRSA (ambos en Austria).

País	Número aislamientos		
	S	I	R
Austria	1789	8	2
Hungría	1167	2	0
Inglaterra	3063	1	0

Tabla 2: Casos confirmados de VISA en Europa según el estudio EARSS 2008.

1.4.2.3. Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) son antibióticos muy usados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas que poseen mecanismos de acción y de resistencia muy relacionados. Actúan a nivel del ARN ribosomal 23S (ARNr 23S) de la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la fase de elongación de la síntesis proteica por bloqueo de la translocación o de la transferencia peptídica.

El mecanismo de resistencia más frecuente de *S. aureus* a MLS es a través de la metilación de su diana (ARNr 23S) por acción de metilasas codificadas por genes *erm*. También juega un papel importante la expulsión activa del antimicrobiano, codificada por genes como *mefA*, *mefE*, *mrsA*, *mrsB*, *erpA*, *erpB*, *vgaA* y *vgaB* (Torres. 2002). La presencia de genes *erm* confiere un tipo de resistencia que puede presentarse constitutiva o inducible; por ello, a la hora de determinar la sensibilidad de una cepa, hay que tener presente la resistencia inducible a clindamicina que no es detectada por las pruebas rutinarias de susceptibilidad, sino que requiere otros métodos como la prueba de doble difusión en disco (figura 8), donde se observa un aplanamiento del halo de inhibición del disco clindamicina en la zona de influencia de la eritromicina que se asemeja a la letra D (Siberry *et al.*, 2003).



Figura 8: Test de inducción, a la derecha el disco de clindamicina y a la izquierda el de eritromicina separados 15 mm.

1.4.2.4. Resistencia a los aminoglucósidos

Su diana primaria de actuación está en la subunidad 30S de los ribosomas donde se unen a diferentes proteínas S y al ARNr 16S; bloqueando la actividad normal del complejo de iniciación, impidiendo el inicio de la síntesis y provocando una lectura errónea del ARNm. No existe de forma natural un mecanismo intrínseco de resistencia de bajo nivel, siendo el fenotipo sensible el más frecuente. El mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos con mayores implicaciones clínicas en *S. aureus* son las modificaciones enzimáticas por acetilación, fosforilación o nucleotidilación de grupos amino e hidroxilo (Torres. 2002).

1.4.2.5. Resistencia a las fluorquinolonas

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la ADN-girasa bacteriana (topoisomerasa II). Se han descrito varios mecanismos de resistencia a las fluorquinolonas en *S. aureus*: mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, que codifican la producción de la ADN-girasa; mutaciones en los genes *parC* y *parE*, que codifican la producción de la topoisomerasa IV y mutaciones en el gen *morA*, responsables de un mecanismo de expulsión activa (Torres. 2002).

En nuestro medio, la resistencia de *S. aureus* a ciprofloxacino ha ido aumentando a lo largo de los años; actualmente presenta cifras elevadas (37,4%) y constituye un marcador más de SARM de adquisición relacionada con los cuidados sanitarios. Por el contrario, una cepa de SARM será con gran probabilidad de origen comunitario si es sensible a este antimicrobiano (Cercenado and Ruiz de Gopegui, 2008).

1.4.2.6. Resistencia a las oxazolidinonas

Actualmente la única oxazolidinona utilizada en la práctica clínica es el linezolid, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la formación del complejo de iniciación en la síntesis de proteínas bacterianas. Aunque la

resistencia de *S. aureus* al linezolid es muy poco frecuente ya se han descrito cepas resistentes en nuestro país (Cuevas *et al.*, 2008). La resistencia puede deberse a una mutación en el gen que codifica la subunidad 23S del ARNr o puede estar mediada por el gen *cfr*, que codifica una metil-transferasa que modifica la diana del 23S ARNr (Toh *et al.*, 2007).

1.4.2.7. Resistencia a la daptomicina

La daptomicina es un antibiótico aislado a partir de cultivos de *Streptomyces roseosporus*. Estructuralmente se trata de un lipopéptido macrocíclico natural, activo exclusivamente frente a bacterias grampositivas. Actúa insertándose directamente en la membrana citoplasmática, ya que al unirse a las moléculas de fosfatidilglicerol provoca un cambio conformacional, dependiente de la concentración los iones de calcio (Ca^{2+}). La consecuencia es una rápida despolarización de la membrana bacteriana y la salida al exterior celular de una corriente de iones potasio (K^+). Estos cambios determinan una rápida detención de los procesos de síntesis proteica y de ácidos nucleicos (ADN y ARN), lo que provoca la muerte de la célula bacteriana. Es efectiva tanto en fase de crecimiento como estacionaria, lo que la convierte en una excelente alternativa con efecto sobre bacterias formadoras de biofilm; y produce una lisis celular insignificante, aspecto importante para el tratamiento de bacteriemia y sepsis.

Sus peculiaridades tanto químicas como funcionales, posibilitan su eficacia frente a aislados de SARM, sin que se produzcan resistencias cruzadas con otros antibióticos (Alder. 2005).

En cuanto a los mecanismos de resistencia son poco conocidos. Los estudios *in vitro* han demostrado que es difícil generar aislamientos resistentes, y que posee una importante barrera genética (Hernandez Marti *et al.*, 2007). Recientemente se ha identificado una resistencia clínicamente significativa, en un varón de 54 años con enfermedad hepática avanzada, tratado con daptomicina por una bacteriemia por SARM. Su aislamiento inicial de *S. aureus*

fue sensible, pero a los 28 días de tratamiento se detectó resistencia, con una CMI de 2 mg/L (Mangili *et al.*, 2005), la resistencia parece inducida por tratarse de un ciclo de tratamiento prolongado. Se ha publicado un nuevo caso de resistencia en un paciente de 82 años, tras tratamiento de una infección de prótesis causada por SARM y tratada durante varias semana con daptomicina; la cepa presentaba además criterios de hVISA (Sivakumar *et al.*, 2012).

1.4.3. Situación actual en Europa

Los datos proporcionados por el sistema de vigilancia EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) en el 2010, muestran un gradiente de norte a sur, variando desde menos del 1% en el norte hasta el 50% en los países del sur de Europa; siendo Suecia el que presenta un menor porcentaje de SARM (0,49%) en contraposición con Portugal que presenta las el dato más preocupante (53,40%). En el norte de Europa la prevalencia se encuentra por debajo del 5%, excepto en Lituania (14,12%) y Letonia (13,73%). Ocho países mostraron prevalencias mayores o iguales al 25% (Austria, Chipre, Grecia, Hungría, Italia, Malta, Rumania y España) y únicamente Portugal presenta una tasa superior al 50% (figura 9). Una de las razones que explicaría las variaciones en las tasas de resistencia es la presión antibiótica selectiva que ejercen las diferentes políticas antibióticas (Bronzwaer *et al.*, 1999).

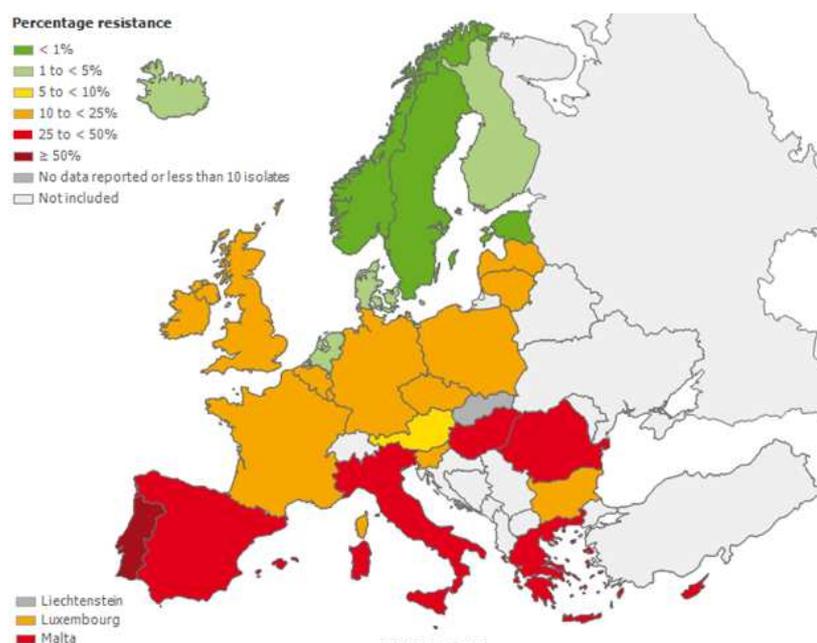


Figura 9: Distribución geográfica del porcentaje de bacteriemia por SARM durante el 2010. Datos procedentes del estudio EARSS 2010. www.earss.rivm.nl

Respecto a los datos proporcionados en 2009, durante el 2010 en 11 países se observaron menores tasas de SARM; República Checa, Dinamarca, Francia, Grecia o Italia presentaron una ligera disminución, mientras que en Estonia, Irlanda, Malta, Polonia, Suiza o Reino Unido este descenso ha sido más importante. Sin embargo, en Bulgaria, Alemania, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Portugal, Rumania o Eslovenia se ha producido un aumento significativo; mientras que en Bélgica, Chipre o España las tasas se han mantenido estables en estos últimos dos años.

Los datos de SARM en España proporcionados por el estudio EARSS durante el periodo 2000-2010 (tabla 3), muestran una ligera estabilidad en la proporción de resistencia a meticilina.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
SARM	28%	23%	23%	24%	26%	27%	25%	25%	26%	26%	25%

Tabla 3: Evolución del porcentaje de bacteriemias de SARM en España según el estudio EARSS 2010.

Para analizar la situación en España, podemos partir del estudio multicéntrico publicado por Cuevas y colaboradores en el que participaron 145 hospitales, en él se muestra la evolución de la resistencia de *S. aureus* a diferentes antimicrobianos desde 1986 a 2006, y se observa que la resistencia a oxacilina se ha mantenido prácticamente estable desde el año 2002 (31,2%) y en 2006 se ha situado en el 29,2%; así como la resistencia a eritromicina (31,7%), clindamicina (19,9%) y ciprofloxacino (37,4%). En 2006 los aislados fueron más sensibles a gentamicina (el 16,9% en 2002 frente al 8,6% en 2006), ninguno presentó sensibilidad disminuida a vancomicina y la resistencia a cotrimoxazol (0,9%) y rifampicina fue muy baja. Sólo un aislado, de los 463 estudiados, fue resistente a linezolid (resistencia 0,2%). Se detectaron SARM en todas las áreas geográficas estudiadas y se observó un aumento de SARM en 2006 respecto al estudio del 2002 en todas las áreas, excepto en Galicia, Asturias, Cantabria, Madrid, Andalucía, Ceuta y Melilla. En cuanto a la presencia de aislados de SARM en el medio extrahospitalario, las cifras son

estables: 17,8% en 2002 frente al 17,9% en 2006. Al estudiar el porcentaje de SARM atendiendo al tamaño del hospital, se observó que para hospitales de menos de 500 camas la tasa de SARM fue 28,6% (28,8% en 2002), para hospitales de 500-1.000 camas fue del 29,8% (29,8% en 2002) y para hospitales de más de 1.000 camas fue del 29,1% (36,6% en 2002). El porcentaje de cepas de SARM en el servicio de Medicina Intensiva no experimentó variaciones significativas ya que el fue del 34,1% en 2002 frente al 36,1% en 2006 (Cuevas *et al.*, 2008).

Datos más recientes de sensibilidad antibiótica de aislamientos invasivos aportados por el informe EARSS 2010 muestran porcentajes de resistencia entre el 25-30% para oxacilina, eritromicina, ciprofloxacino y levofloxacino. No se han encontrado en España cepas resistentes a vancomicina o linezolid (tabla 4).

<i>Antibiótico</i>	<i>N</i>	<i>S (%)</i>	<i>I (%)</i>	<i>R (%)</i>	<i>IC95% (%R)</i>
<i>Oxacilina</i>	1.998	74,8	-	25,2	23,3-27,2
<i>Eritromicina</i>	1.998	71,7	1,1	27,2	25,3-29,2
<i>Ciprofloxacino</i>	1.313	69,1	1,9	29,0	26,6-31,6
<i>Levofloxacino</i>	1.667	71,9	0,8	27,3	25,2-29,5
<i>Gentamicina</i>	1.936	93,9	0,8	5,3	4,4-6,4
<i>Vancomicina</i>	1.998	100	0	0	---
<i>Rifampicina</i>	1.839	99,0	0,5	0,5	0,2-1,0
<i>Clindamicina</i>	1.792	88,0	1,0	11,0	9,6-12,6
<i>Linezolid</i>	1.954	100	0	0	---

Tabla 4: Prevalencia de resistencia a antibióticos en España según el estudio EARSS 2010.

Este mismo informe muestra la prevalencia de resistencia a antibióticos en función del servicio hospitalario de procedencia (tabla 5).

<i>Servicio hospitalario</i>	<i>Oxacilina (%R)</i>	<i>Ciprofloxacino (%R)</i>	<i>Eritromicina (%R)</i>	<i>Gentamicina (%R)</i>
<i>UCI</i>	28,1	29,2	31,3	9,6
<i>Med. interna</i>	28,3	32,6	30,1	7,0
<i>Urgencias</i>	21,0	26,1	26,4	6,0

Tabla 5: Prevalencia de resistencia a antibióticos en aislamientos invasivos según servicio hospitalario en España según el estudio EARSS 2010.

1.4.4. Medidas de prevención para el control de la propagación

Pese a que la prevalencia de SARM en los hospitales, especialmente como causa de bacteriemia, está disminuyendo en algunos países europeos (Wyllie *et al.*, 2011)(Jarlier *et al.*, 2010); continúa siendo un problema destacado en salud pública. Es una causa importante de morbilidad en los pacientes ingresados, sobretodo en las unidades de Medicina Intensiva; aumentando el tiempo de estancia, los costes de tratamiento, y lo que es más importante, el riesgo de muerte.

A nivel hospitalario, controlar la propagación de SARM exige medidas capaces de romper la cadena de transmisión. La detección de pacientes colonizados, su aislamiento y descolonización; la reducción de la presión antibiótica favoreciendo una prescripción más dirigida, y la correcta limpieza de manos; son algunas de las medidas instauradas para el control de esta infección.

Existe controversia acerca de los beneficios del cribado universal de SARM. Estudios como el publicado por Robotham y colaboradores, parecen demostrar que el cribado universal no es rentable en muchas situaciones, y que los beneficios se producen siempre que vengan acompañados de la descolonización de los portadores, lo que no siempre es viable (Robotham *et al.*, 2011). La mayoría de los programas de cribado se dirigen a pacientes considerados de alto riesgo: pacientes con antecedentes de colonización o infección por SARM, con historial de múltiples ingresos, procedentes de hospitales de agudos o de centros sociosanitarios; recomendando el cribado universal únicamente en unidades de Medicina Intensiva, donde el riesgo de transmisión y sus posibles consecuencias son mayores (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Jarlier y colaboradores, que incluyó 38 hospitales franceses, se confirma la disminución de infección por SARM de un 41 a un 26% cuando se introduce un programa de control en pacientes del servicio de Medicina Intensiva, y se mantienen las medidas en el tiempo (Jarlier *et al.*, 2010).

Una vez seleccionada la población que debe incluirse en el cribado, el método a utilizar debe tener presente la relación coste-beneficio. Los cultivos convencionales o el empleo de agares cromogénicos, presentan un alto grado de sensibilidad y especificidad pero requieren de 24 a 48 horas para proporcionar un resultado definitivo. Las técnicas moleculares proveen de resultados en pocas horas, pero son más caras y no evitan el uso de cultivos convencionales para realizar estudios de sensibilidad y de tipado molecular (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). Hardy y colaboradores compararon la eficacia del cultivo frente a la PCR en el control de pacientes quirúrgicos, informando de una reducción de la tasa de transmisión de SARM cuando se utilizaban métodos moleculares rápidos, al facilitar una aplicación más temprana de medidas de control, especialmente la descolonización tópica (Hardy *et al.*, 2010). Datos similares a los publicados por Robotham y colaboradores, quienes concluyen que la PCR es rentable únicamente cuando se acompaña de una descolonización precoz, no encontrando diferencias significativas respecto al cultivo, cuando la única medida instaurada era el aislamiento de los portadores (Robotham *et al.*, 2011). Los beneficios de los métodos rápidos de cribado se limitan a pacientes y zonas de alto riesgo, ya que el empleo de estas pruebas en todos los pacientes no resulta efectiva, en términos de coste-beneficio (Sturenburg, 2009).

Respecto a las localizaciones corporales donde realizar el muestreo de portadores, las guías recomiendan siempre las fosas nasales, principal reservorio de *S. aureus*. La búsqueda en otras localizaciones como axilas o periné, encarecen el estudio, pero aumentan la sensibilidad diagnóstica y las tasas de detección (Eveillard *et al.*, 2006).

La descolonización nasal con mupirocina, se ha utilizado para prevenir la transmisión y reducir las infecciones endógenas por SARM. Su utilización de forma indiscriminada, repetida y prolongada, ha generado problemas de resistencia, fracasos en pacientes con colonización cutánea en múltiples localizaciones, recaídas y recolonizaciones (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008)(Immerman *et al.*, 2012); por ello, se recomiendan pautas cortas,

monitorizar la sensibilidad al fármaco, seleccionar los pacientes y disponer de alternativas en los casos en los que se confirme resistencia (Ammerlaan *et al.*, 2011). Se ha comprobado que el uso de la mupirocina y de antisépticos como la clorhexidina en profilaxis prequirúrgica, reduce la incidencia de infección (van Rijen *et al.*, 2008).

La conveniencia y las pruebas de detección a realizar dependen, fundamentalmente, de la prevalencia de SARM en ese área, de la economía y capacidad del sistema de salud, el tipo de institución, la infraestructura y los recursos disponibles, así como de la experiencia del personal sanitario que atiende a los pacientes (Harbarth *et al.*, 2011).

La prevención de las infecciones nosocomiales o de IACS por *S. aureus* basada en vacunas, se encuentra en fase de estudio. El desarrollo de una vacuna estafilocócica es complejo, debido al carácter pleomórfico de la bacteria y a las diferentes características de los grupos de riesgo. Existen en la actualidad varias vacunas, en fase experimental, para la prevención de neumonías causadas por *S. aureus*, dirigidas frente a proteínas de superficie, polisacáridos y toxinas. A pesar de los esfuerzos, los estudios muestran resultados poco satisfactorios y plantean la necesidad de introducir en una misma vacuna una combinación adecuada de múltiples antígenos que mejoren la capacidad inmunógena (Huda *et al.*, 2011). Otros grupos plantean la necesidad de que la FDA americana apruebe los ensayos que incluyen la célula completa de *S. aureus*, pues de lo contrario no estaremos cerca de desarrollar una vacuna segura y eficaz; y aunque no se pueda cumplir el objetivo de disponer de la vacuna para el año 2016 como se pretendía, se espera que al menos se disponga de la autorización para ese año (Patti. 2011).

Las estrategias a seguir para el control del SARM comunitario, son aún más complejas. A la dificultad de intervenir en poblaciones con un riesgo elevado de desarrollar una infección, se une la posible colonización gastrointestinal de los animales de compañía, que actuarían como reservorios. Por tanto, las principales medidas de control se basan en limitar o retrasar la diseminación en grupos de riesgo como niños, deportistas o presos, por citar

algunos; mediante la higiene personal (higiene de manos, mantener las lesiones de la piel cubiertas, no compartir elementos de higiene, ducharse diariamente, cubrirse al toser y estornudar), higiene ambiental (utilizar desinfectantes en la limpieza del domicilio, cambiar sábanas y toallas regularmente, lavar con agua tibia o caliente, secar en caliente o tibio) y cuidados en la convivencia y el contacto social (no participar en deportes que requieren contacto físico, evitar acudir a gimnasios públicos, saunas o piscinas si se está infectado).

En las afecciones gastrointestinales por *S. aureus* en la comunidad, las estrategias más específicas y efectivas implican la adopción de medidas higiénico-sanitarias por parte de los manipuladores de alimentos, consistentes en el lavado correcto de manos; el uso de mascarilla, gorro y guantes; no participar en la preparación de comidas cuando exista una infección de nariz, ojos, piel o heridas; mantener la cocina limpia y desinfectada; almacenar la comida a más de 60°C o por debajo de 4°C si se tarda más de dos horas en su consumo, siguiendo las recomendaciones de centros oficiales, como el CDC (http://www.cdc.gov/ncidod/DBMD/diseaseinfo/staphylococcus_food_g.htm).

1.5. Métodos de tipado molecular para estudios epidemiológicos

El desarrollo de técnicas de biología molecular, dirigidas a la tipificación de aislados, ha dado lugar al concepto de epidemiología molecular. Su aplicación a nivel individual, permite discernir entre reinfección y recaída en aquellos pacientes que presentan más de un episodio infeccioso causado por un determinado patógeno; a nivel colectivo, es capaz de diferenciar las cepas implicadas en un brote en clusters, de acuerdo con su nivel de similitud genotípica (Coll *et al.*, 2005).

El objetivo de la tipificación es establecer relaciones epidemiológicas para colaborar en la instauración de medidas que reduzcan la expansión clonal, y a posteriori, analizar la eficacia de las medidas implantadas.

Para distinguir entre aislados de una misma especie, se emplean técnicas que comparan la composición de los ácidos nucleicos, también llamadas genotípicas, las cuales alcanzan un mayor poder de discriminación que los métodos fenotípicos basados en diferencias bioquímicas, antigénicas, lisogénicas o de sensibilidad antibiótica. El análisis de los perfiles de resistencia es el método más empleado en la rutina diaria, pero en el caso de SARM y de otros patógenos multirresistentes, presenta un bajo poder de discriminación.

Se ha demostrado que *S. aureus* está implicado en brotes de mayor o menor entidad con mucha frecuencia, siendo una de las primeras bacterias para las que se han desarrollado métodos de tipado precisos (Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994). Las técnicas genotípicas más empleadas para *S. aureus* consisten en la electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE), el tipado de secuencias multilocus (MLST), el tipado mediante la proteína A (*spa typing*), la amplificación de secuencias genéticas con o sin restricción posterior del producto obtenido (PCR-RFLP o PCR), el análisis de ADN por secuenciación y el estudio de perfiles de hibridación de múltiples secuencias (*microarrays*). De acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), el método a elegir dependerá de la capacidad técnica del laboratorio y de la rapidez necesaria para resolver la situación epidemiológica (Coll *et al.*, 2005).

1.5.1. Electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE)

La PFGE o macrorrestricción se basa en la digestión del ADN cromosómico bacteriano con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte. Los fragmentos de ADN obtenidos, requieren para su separación técnicas de electroforesis en campo pulsante, en las que la orientación del campo eléctrico varía periódicamente (pulsos). De todos los sistemas desarrollados para este fin, el más extendido ha sido el CHEF (*clamped homogeneous electric field electrophoresis*) gracias a su capacidad para separar, simultáneamente, varias muestras en patrones de bandas rectos.

Como resultado se obtienen patrones de restricción de ADN distribuido en pocas bandas, bien definidas, con movilidades electroforéticas distintas, lo que facilita el análisis y la comparación de múltiples aislados. Se utiliza, generalmente, la enzima *SmaI* que da lugar a fragmentos de entre 10 y 700pb.

La interpretación de los resultados de la PFGE, se basa en los criterios propuestos por Tenover y colaboradores (Tenover *et al.*, 1995), que analizan el grado de diferencia entre los patrones encontrados, para así establecer relaciones epidemiológicas.

Los principales inconvenientes de esta técnica radican en la necesidad de un equipo caro, de uso exclusivo y en que se requieren varios días para su realización. Se añade la subjetividad de la interpretación de los patrones de bandas, y a la ausencia de normalización para cuantificar la distancia genética (Enright *et al.*, 2000).

La reproducibilidad intra e interlaboratorio de esta técnica supuso un gran desafío (Murchan *et al.*, 2003). Los estudios multicéntricos que emplean el PFGE se realizan en la actualidad de acuerdo a directrices de estandarización de los pasos con mayor potencial de variabilidad, como la preparación de la muestra de ADN (el proceso debe conducir al aislamiento del cromosoma bacteriano intacto, con una calidad y concentración que permitan reproducir la restricción de la enzima y distinguir los patrones de bandas), la elección de la enzima de restricción y de los pulsos electroforéticos en función de los tamaños de fragmentos de ADN a separar. El análisis de los resultados se ha normalizado gracias al desarrollo de *softwares* específicos (Cookson *et al.*, 2007).

El PFGE ha quedado reservado a laboratorios de referencia, debido a los requerimientos técnicos, y a la complejidad en la realización e interpretación de las técnicas. Las técnicas de macrorrestricción presentan la limitación de no detectar diferencias puntuales entre secuencias, ni la existencia de elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones; por lo que pese a ser

considerando el método de referencia o “*gold standard*” para la mayoría de las bacterias clínicamente relevantes (Goering. 2010), en los últimos años se han desarrollado otras técnicas basadas en el análisis de secuencias.

1.5.2. Tipado de secuencias multilocus (MLST)

El MLST, consiste en la amplificación de 7 locis representados en genes *housekeeping* (genes esenciales para las funciones celulares presentes en todos los organismos y muy conservados), seguido de la secuenciación y comparación del producto obtenido con alelos conocidos en una base de datos internacional, que contiene más de 3000 aislados (<http://www.mlst.net>).

Este método se ha diseñado para analizar y comparar la variación genética en colecciones de bacterias de todo el mundo, ya que muestra las divergencias de nucleótidos del genoma del núcleo, informa sobre el origen clonal de un grupo de cepas, la tasa de recombinación y la relación filogenética entre ellas. El perfil alélico obtenido consiste en un código de 7 números, que se traduce en una secuencia tipo (por ejemplo, los aislados del conocido como clon brasileño, presentan el código 2-3-1-1-4-4-3 correspondiente con la secuencia tipo ST 239).

Su principal ventaja es la estandarización y unificación de la colección de datos en todo el mundo; y entre sus limitaciones destaca un poder de discriminación relativamente bajo, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos a nivel local, así como un coste elevado.

1.5.3. Tipado mediante proteína A (*spa* Typing)

Se basa en la secuenciación de una región altamente polimórfica del gen que codifica para la proteína A. Como en el caso del MLST, requiere de la secuenciación del producto obtenido, una vez amplificada la región polimórfica seleccionada X.

El perfil de *spa* se identifica mediante un número que representa la sucesión de cada repetición individual de la región X (por ejemplo el *spa t030* presenta una secuencia de repetición 15-12-16-02-24-24 y se corresponde con la secuencia ST239 en MLST), y también cuenta con una base de datos internacional para estandarizar la nomenclatura de los tipos (<http://spaserver.ridom.de>).

Sus principales ventajas son la rapidez y la facilidad de realización e interpretación, sin embargo obtiene información sesgada al incluir un solo locus y no siete, como en el MLST, o la totalidad del ADN cromosómico como en el PFGE. Estudios como el publicado por el grupo de Mitani, demuestran un poder de discriminación limitado, considerando que tiene utilidad como herramienta de análisis preliminar, que debería acompañarse de otras técnicas con mayor poder de discriminación (Mitani *et al.*, 2005).

1.5.4. Amplificación de secuencias genéticas sin restricción posterior del producto obtenido (PCR)

La principal característica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es su capacidad de amplificar o replicar una secuencia determinada de ADN para obtener múltiples copias (hasta 10^6 veces). Como resultado, se obtienen patrones constituidos por un número de bandas de ADN que permiten una interpretación y comparación fácil entre cepas.

Se ha empleado una región hipervariable del dipéptido serina-aspartato (SD) del clumping factor B (*clfB*) como marcador molecular para el genotipado de *S. aureus* por PCR, capaz de detectar variaciones genéticas recientes con una buena estabilidad *in vitro*, *in vivo* y en la transmisión entre pacientes (Koreen *et al.*, 2005). Estos mismos autores, establecieron la utilidad del *clfB* para conocer microvariaciones entre cepas que presentaban patrones de proteína A muy relacionados, y establecieron una buena correlación con el PFGE. Estos datos fueron confirmados por Kuhn y colaboradores (Kuhn *et al.*, 2007), quienes tras estudiar cuatro posibles marcadores moleculares mediante

PCR para *S. aureus* (*clfA*, *clfB*, *fnbA* y *spa*) y compararlos con el PFGE, concluyeron que la combinación *spa* + *clfB* aportaba resultados comparables a los de la técnica de referencia. Del mismo modo, un estudio reciente de Ugolotti y colaboradores compara el índice de discriminación (ID) del PFGE con el de la combinación *spa* + *clfB*, obteniendo un valor ID superior para la combinación, lo que apoyaría su utilidad en cepas estrechamente relacionadas. (Ugolotti *et al.*, 2011).

Otros métodos de tipado por PCR, emplean *primers* de pequeño tamaño, dirigidos a secuencias arbitrarias (AP-PCR). El número y localización de las secuencias complementarias es aleatoria, por lo que diferentes cepas generarán diferentes patrones. El mayor inconveniente de esta técnica es su bajo poder de discriminación y la reproducibilidad, aunque el estudio realizado por Kondoh y colaboradores con 78 aislados de SARM, refiere una buena correlación entre los resultados obtenidos por AP-PCR y por PFGE (Kondoh *et al.*, 2002).

Por tanto el empleo de la PCR en la tipificación bacteriana permite obtener resultados de forma rápida y sencilla; puede emplearse como primer paso ante la sospecha de un brote, pero debe complementarse con otras técnicas que mejoren el de discriminación.

1.5.5. Amplificación de secuencias genéticas con restricción del producto obtenido (PCR-RFLP)

Las enzimas o endonucleasas de restricción reconocen una secuencia de nucleótidos determinada, dentro de una molécula de ADN, y la cortan en un punto en concreto conocido como diana de restricción. El número de fragmentos que se obtienen es equivalente a las veces que se encuentra repetida la diana. El tamaño de los fragmentos, dependerá de la separación entre dos lugares de restricción continuos; y los cambios, ya sean por recombinación o mutación, conducirán a diferentes perfiles de restricción.

La PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) consiste en diferenciar cepas a partir de las secuencias digeridas por las restrictasas, quienes a su vez, reflejan las diferencias en la composición de nucleótidos. Como marcadores moleculares se suelen emplear genes que presenten locis con un número variable de repeticiones en tándem, como pueden ser la coagulasa, la proteína A o el *mecA*.

La producción de coagulasa es uno de los criterios principales usados en el laboratorio de microbiología para la identificación de *S. aureus* y son varios los estudios que la utilizan como marcador molecular para su análisis mediante PCR-RFLP, en concreto se basan en el polimorfismo en la región 3' que codifica el gen de la coagulasa (*coa*). Goh y colaboradores obtuvieron una buena correlación de este método de tipado al compararlo con la Electroforesis Enzimática Multi Locus (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis*, MLEE) obteniendo 10 patrones diferentes de RFLP con la enzima *Alu I* partiendo de 30 aislados (Goh *et al.*, 1992).

En un estudio posterior, publicado por Hookey y colaboradores, el empleo de dos enzimas de restricción (*Alu I* y *Cfo I*), diferenció un total de diez patrones del gen de la coagulasa entre 95 aislados de SARM de clones predominantes en el Reino Unido; demostrando su valor para un genotipado preliminar cuando se compara con el fagotipado (Hookey *et al.*, 1998).

El empleo de la proteína A como marcador fue desarrollado por Frenay (Frenay *et al.*, 1996) empleando las secuencias de la región X polimórfica del gen *spa*. Aunque se han empleado diferentes primers y enzimas de restricción, varios son los estudios que confirman la tipabilidad de esta bacteria empleando la PCR-RFLP para la proteína A (Soltan-Dallal *et al.*, 2010)(Mitani *et al.*, 2005).

La combinación de ambos genes (*coa* y *spa*) ha sido la más empleada en estudios de tipado por PCR-RFLP. El grupo de Wichelhaus (Wichelhaus *et al.*, 2001) emplean estos genes, junto con el *mecA*, para estudiar un total de 46

cepas de SARM previamente analizadas por PFGE, y confirman la utilidad del PCR-RFLP combinada como un método rápido y potente de caracterización molecular, que podría ser aplicable a la rutina en la vigilancia epidemiológica. Resultados concordantes con los del estudio de Montesinos y colaboradores, quienes comparan los perfiles de 124 aislados SARM procedentes del Hospital Universitario de Canarias, y analizados por PFGE y PCR-RFLP (*coa* y *spa*), resaltando la buena correlación entre ambos métodos (Montesinos *et al.*, 2002). Un estudio reciente realizado a 135 cepas procedentes de un hospital Obstétrico-Ginecológico en Polonia, la PCR-RFLP de los genes *coa* y *spa* diferencia 25 clusters que incluyen un número variable de cepas cada uno, y 32 cepas de patrón único; lo que vuelve a reforzar la idea de que *S. aureus* es una especie genéticamente muy diversa, y que esta técnica de tipado posee un gran poder de discriminación (Szczyka *et al.*, 2010).

La utilidad de la combinación de PCR-RFLP *coa-spa* y PCR *clfB* para la caracterización genotípica de *S. aureus*, la demuestran Viana y colaboradores (Viana *et al.*, 2007) al comprobar la tipabilidad de 301 aislados obtenidos de lesiones de conejos y demostrar la facilidad, bajo coste, estabilidad y rapidez de este método para estudios epidemiológicos y en brotes. Estos autores obtienen seis productos de digestión para la coagulasa, siete para la proteína A y siete tamaños diferentes de amplificado para el clumping factor B; lo que resulta en un total de 22 genotipos distintos al combinar los resultados de los tres genes.

Por tanto, la PCR-RFLP ha mostrado un nivel de reproducibilidad semejante al PFGE y la combinación de los resultados de las diferentes dianas se plantea como la alternativa al PFGE más rentable (Bannerman, 2007) y resulta especialmente útil en el estudio de pequeños brotes nosocomiales (Murchan *et al.*, 2003).

1.5.6. Hibridación de múltiples secuencias (*Microarrays*)

Los métodos tradicionales de biología molecular se basan generalmente en el análisis de unos pocos genes en cada experimento, sin embargo

cualquier ser vivo está formado por cientos de genes y sus productos (ARN, proteínas) que interaccionan entre ellos durante procesos como el crecimiento, desarrollo o procesos patogénicos.

Un microarray es un sustrato sólido sobre el que se encuentra una secuencia ordenada de ADNc (cadena de ADN complementario) o, más habitualmente, de oligonucleótidos que no incluyen elementos repetitivos o secuencias homólogas, formando los diferentes *spots*, cada uno de los cuales representa un gen. Esta tecnología se ha utilizado ampliamente para determinar los niveles de expresión de miles de genes en un solo experimento, así como para la secuenciación de genes, la detección de polimorfismos genéticos o el análisis de la composición del genoma de procariontes.

En el caso de *S. aureus* se han desarrollado microarrays con distintos fines como evaluar las diferencias genéticas entre cepas nosocomiales y comunitarias (Koessler *et al.*, 2006), el genotipado para estudios epidemiológicos (Dunman *et al.*, 2004), el análisis de diferentes genes reguladores como *Agr* (Dunman *et al.*, 2001), caracterizar los mecanismos de resistencia de esta bacteria a determinadas drogas como a los glicopéptidos (Cui *et al.*, 2005) o el Linezolid (Gao *et al.*, 2010) o identificar los loci relevantes en la formación del biofilms (Beenken *et al.*, 2004).

El principal problema de esta nueva tecnología es su complejidad y su elevado coste, lo que la aleja, por el momento, de la práctica clínica.

1.5.7. Espectroscopía de masas

Recientemente se ha introducido en los laboratorios de microbiología la identificación bacteriana basada en el perfil de proteínas obtenido mediante espectroscopia de masas. El MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en espectroscopia de masas constituida por un sistema de desorción / ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (TOF:

Time-Of-Flight) usado para el análisis de moléculas de peso molecular elevado y termolábiles.

Las ventajas fundamentales son la sencillez para su realización y la rapidez con la que se obtienen los resultados; siendo el mayor inconveniente el coste del equipo. A nivel clínico, se cuestiona la utilidad de la identificación sin disponer de la sensibilidad a los antimicrobianos, dato fundamental para el tratamiento del paciente; aunque en el caso de *S. aureus* se ha apuntado la posibilidad de diferenciar entre cepas de SASM y SARM (Edwards-Jones *et al.*, 2000); o entre cepas productoras o no de LPV (Bittar *et al.*, 2009). Respecto al uso del MALDI-TOF para el tipado de cepas de *S. aureus*; Jackson y colaboradores han propuesto un protocolo estandarizado útil para este fin (Jackson *et al.*, 2005), sin embargo no se han comparado los resultados con el método de referencia PFGE (Murray, 2010). En otro estudio reciente se comparó el tipado obtenido con el MALDI-TOF con la técnica de secuenciación *spa-typing* en 60 cepas clínicas de SARM; los resultados mostraron una elevada concordancia entre ambos métodos que diferenciaron los aislados en los diferentes complejos clonales CC5, CC8, CC22, CC30 y CC45; por lo que plantean que MALDI-TOF podría ser una herramienta de cribado para el control de la infección por SARM (Wolters *et al.*, 2011).

2. Objetivos

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista, agente causal de numerosas infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales. Se caracteriza por su rápida adaptación ante la presión antibiótica, y especialmente por su resistencia a los β -lactámicos (SARM), a la que suele añadirse resistencia a otros grupos de antimicrobianos; limitando, de forma preocupante, las alternativas terapéuticas.

Las infecciones nosocomiales causadas por cepas de SARM, son un problema de salud importante en todo el mundo. Las cepas de *S. aureus* meticilin resistentes, son capaces de aumentar por sí solas la incidencia global de la infección estafilocócica, asociándose a mayor morbimortalidad y costes económicos, con respecto a las causadas por *S. aureus* sensibles. Su comportamiento es epidémico y se transmite fácilmente a través de las manos contaminadas, a través de objetos, o directamente desde un individuo colonizado. Por ello, la vigilancia y el control de SARM debe ser una prioridad para todos los centros hospitalarios.

La introducción de técnicas de tipificación molecular, permite conocer el origen y las vías de diseminación de este microorganismo en caso de brote, por lo que se han introducido en las investigaciones epidemiológicas como una herramienta más.

El aumento, durante el año 2007 y 2008, de la incidencia de SARM en nuestro Departamento de Salud, nos llevó a la realización de estudios de prevalencia y tipado molecular; con el objeto de caracterizar los aislados, conocer los genotipos circulantes y evaluar la situación en nuestro entorno. Con el fin de validar el método de tipado, a la selección de aislamientos de nuestra zona de influencia, añadimos el estudio de una colección de cepas no relacionadas epidemiológicamente, procedentes de otros Departamentos de Salud; en concreto dos centros terciarios pertenecientes a las provincias de Valencia y Castellón, y un centro de segundo nivel situado en la provincia de Alicante.

Los objetivos del estudio fueron:

1. Conocer el porcentaje de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en el Departamento de Salud de la Ribera entre marzo 2007 y septiembre 2008.
2. Estudiar la existencia de Leucocidina de Panton Valentine en una selección de aislados de *S. aureus* de origen comunitario.
3. Evaluar la utilidad del genotipado mediante PCR-RFLP a partir de 3 genes distintos - *coa* (coagulasa), *spa* (proteína A), *clfB* (clumping factor B) - como herramienta de análisis epidemiológico.
4. Comparar los resultados obtenidos del genotipado PCR-RFLP con un método de referencia: Electroforesis de Fragmentos de Restricción en Campo Pulsante (PFGE). Evaluar el poder discriminatorio y la concordancia entre los marcadores de tipado propuestos.
5. Conocer la utilidad del genotipado por PCR-RFLP en la detección de clonalidad de un brote de SARM en un Servicio de Medicina Intensiva.

Para cumplir dichos objetivos se realizó un estudio prospectivo de aislados de *S. aureus* obtenidos en el Área de salud del Departamento 11 de la Comunidad Valenciana (Hospital y centros de salud) durante 18 meses (marzo 2007 a septiembre 2008). Además se contó con aislados procedentes del Hospital Clínico Universitario de Valencia (agosto a noviembre 2008), el Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy en Alicante (noviembre 2008 a enero 2009) y el Hospital General de Castellón (septiembre a diciembre de 2008).

Se siguieron las siguientes etapas metodológicas:

- I. Definición de caso y procedencia del aislado. Se seleccionaron las cepas de pacientes con al menos un aislado de *S. aureus* clínicamente significativo y se estableció si su procedencia era nosocomial, comunitaria o asociada a cuidados sanitarios.
- II. Análisis microbiológico. Identificación y estudio de sensibilidad para detectar el porcentaje de SARM, así como la resistencia al resto de antibióticos.
- III. Confirmación de la resistencia a la meticilina mediante la detección del gen *mecA* por PCR de todos los aislados incluidos en el estudio.
- IV. Detección de la existencia de Leucocidina de Panton Valentine mediante amplificación del gen *Luk-PV* por PCR.
- V. Genotipado mediante PCR-RFLP utilizando tres genes distintos: *coa* (coagulasa), *spa* (proteína A) y *clfB* (clumping factor B).
- VI. Genotipado mediante PFGE.
- VII. Análisis comparativo entre ambos métodos.

3. Material y Métodos

3.1. Origen de los aislados

Para la realización del presente estudio se analizaron 129 aislados de *S. aureus* procedentes del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de La Ribera, y se contó con 126 aislados más procedentes de los siguientes hospitales: Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy (HVLA) y Hospital General de Castellón (HGC), quienes colaboraron con 49, 53 y 24 aislados, respectivamente.

Como controles se incluyeron dos cepas; una solicitada a la colección de cultivos de la Universidad de Göteborg (CCUG 47167) productora de Leucocidina de Panton-Valentine y una cepa de *S. aureus* sensible a meticilina, validada como tal por el Programa de Control Externo de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

3.1.1. Recogida de datos

3.1.1.1. Hospital Universitario La Ribera

El Departamento de Salud de la Ribera desarrollaba su actividad durante el periodo de estudio, en lo que era el Área de Salud 11 de la Comunidad Valenciana. El área de la Ribera tenía una población de 236.230 habitantes (con 34.309 menores de 14 años), lo que representaba aproximadamente un 5,72% de la población de la Comunidad Valenciana. La densidad de población de área es de 181,14 – 272,74 habitantes/Km². El 76,86% de la población vive en municipios de más de 10.000 habitantes. El porcentaje de hombres es ligeramente inferior (49,2%) al de mujeres (50,8%). El Hospital Universitario de la Ribera es un hospital de 2º nivel, con 301 camas que daba cobertura a esta población distribuida en más de 40 localidades (figura 10).



Figura 10: Localidades a las que daba cobertura el Hospital Universitario de la Ribera.

La institución cuenta con todos los servicios sanitarios especializados salvo trasplantes, quemados y cuidados intensivos de neonatología.

Admitió durante 2007 un total de 21.490 ingresos, de los cuales 1.752 fueron en la unidad de cuidados intensivos (UCI) con un total de estancias de 7.683. La estancia media de un paciente en UCI en dicho periodo fue de 4,81 días. La UCI dispone de 27 camas, 2 de ellas adaptadas para sistemas de aislamiento. El resto son camas pareadas de atención polivalente dispuestas en boxes separados por vitrinas de cristal y en contacto directo con un área de control médico.

El número total de consultas especializadas fue de 599.108 y el número de pacientes medio en tratamiento con hemodiálisis de 140 que completaron un total de 18.555 sesiones de hemodiálisis.

Los datos demográficos, clínicos y epidemiológicos de los distintos pacientes se recogieron de la historia clínica informatizada del hospital denominado Sistema Integrado de Ayuda Asistencial (SIAS).

Los datos de las muestras se obtuvieron del Sistema Informático de Laboratorio (SIL): Nexus (desde marzo 2007 hasta enero 2008) y Omega 2000 Roche® (desde febrero 2008 a septiembre 2008).

Se seleccionaron 129 aislados de *S. aureus* de entre los 251 obtenidos por el Servicio de Microbiología, durante el periodo comprendido entre marzo 2007 y septiembre 2008. El criterio de selección se basó en la significación

clínica, por lo que no se incluyeron aislados de cultivos de vigilancia (frotis nasal o de piel para la detección de portadores), ni tampoco *S. aureus* que crecieran en cultivos mixtos o polimicrobianos. Los 129 aislados procedían de 120 pacientes (ratio hombre-mujer: 1,55:1; ratio adulto-niño: 9:1) (tabla 6).

En la recogida de los datos, se incluyó la procedencia del paciente estableciéndose tres posibles orígenes para los aislamientos: comunitarios, nosocomiales o infecciones asociadas a cuidados sanitarios (IACS). Se consideró de origen nosocomial a los *S. aureus* procedentes de pacientes que llevaban más de 48 horas ingresados. Se etiquetó de IACS si durante el año anterior se cumplían alguna de las siguientes premisas: estancia de más de 2 días en un hospital, dializados, cuidados sanitarios en domicilio, estancia en hospital de día o pacientes portadores de catéter permanente. Se clasificó como de origen comunitario a los remitidos desde centros periféricos que no cumplían los criterios anteriores o bien pacientes ingresados, en los que el aislamiento ocurría durante las primeras 48 horas desde la admisión (Millar *et al.*; 2007). Se consideraron 61 aislados de adquisición nosocomial, 29 IACS y 39 comunitarios (tabla 6).

	Población				Totales	
	Infantil		Adulta			
	Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%
Hombre	7	58,3	66	61,1	73	60,8
Mujer	5	41,7	42	38,9	47	39,2
Nosocomial	4	33,3	50	46,3	54	45,0
IACS	8	66,7	31	28,7	39	32,5
Comunitaria	0	0	27	25,0	27	22,5

Tabla 6: Origen de los aislados.

3.1.1.2. Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy (HVL) y Hospital General de Castellón (HGC)

Los datos demográficos, clínicos y epidemiológicos de los distintos pacientes se recogieron de la historia clínica, y los de las muestras del SIL utilizado en cada uno de los hospitales. Los aislados de *S. aureus* se remitieron

Material y Métodos

congelados en leche desnatada, manteniéndose a -70°C hasta su procesamiento (Petti, 2007).

Los criterios de selección para el envío de las muestras se refirieron a su significación clínica en el caso del HCUV y del HGC, con una mayor proporción de aislamientos invasivos y muestras procedentes de Medicina Intensiva; y un muestreo general en el caso del servicio de Microbiología del HVLA.

En la figura 11, se encuentra marcada la localización geográfica de cada una de las áreas de salud de la comunidad valenciana que participaron en el estudio.

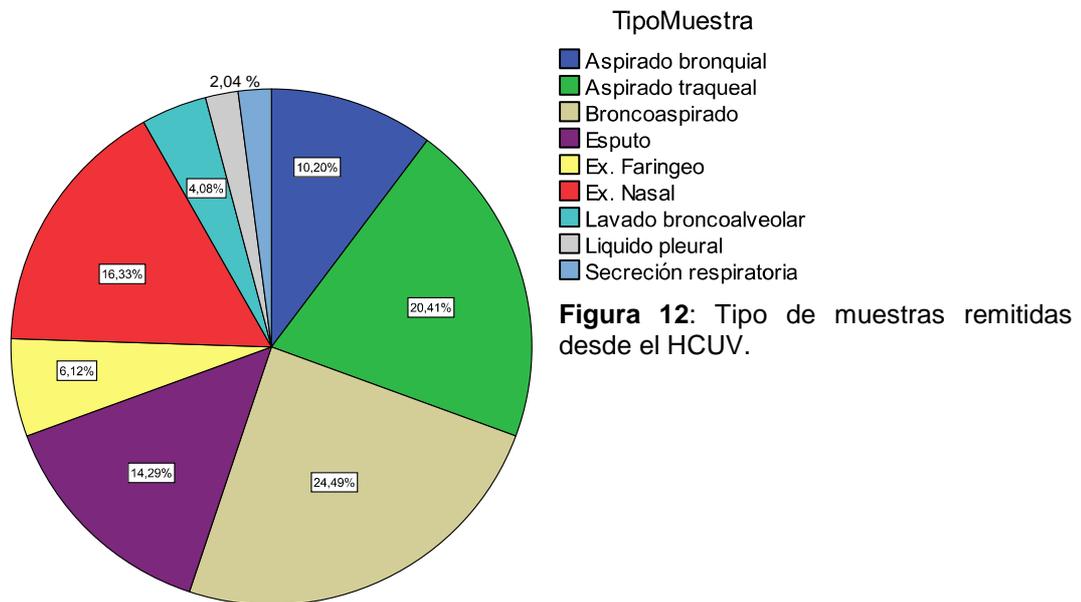


Figura 11: Áreas de salud que participaron en el estudio.

El HCUV es un hospital de 3^o nivel que desarrolla su actividad en el Departamento de Valencia Clínico – La Malvarrosa, anterior Área de Salud 5 de la Comunidad Valenciana, presenta una población de 337.383 habitantes y cuenta con 587 camas.

Del HCUV se incluyeron en el estudio 50 aislados procedentes de 42 pacientes: 77% varones y 23% mujeres, la edad de los pacientes oscilaba entre los 10 días y los 92 años; con una media de 63 ± 22 años. Las muestras, todas ellas de origen respiratorio, procedían un 22,4% de Neumología, un 20,4% de Cirugía Torácica, un 14,3% de Medicina Intensiva, un 12,2% de Reanimación, un 10,2% de Pediatría, un 6,1% de Hemodiálisis, un 4,1% de Cirugía y 10,3% de otros servicios (Neurología, Medicina Interna, Nefrología y Otorrino). En la

figura 12 se detalla el tipo de muestra, entre las que predomina el broncoaspirado (24,49%), seguido del aspirado traqueal (20,41%).



El HVLA es un hospital de 2º nivel que desarrolla su actividad en el Departamento de Salud de Alcoy, anteriormente denominado Área de Salud 15 de la Comunidad Valenciana, presenta una población de 142.631 habitantes y cuenta con 305 camas.

Del HVLA se estudiaron 53 aislados de *S. aureus* obtenidos de sendos pacientes: 49% varones y 51% mujeres, con una edad media de 64±22 años (con un rango de 4 a 95 años).

Respecto al servicio de procedencia, el más frecuente fue Medicina General con un 39,6%, Pediatría y Cirugía ambas con un 13,2%, un 9,4% de Neuro-Psiquiatría, un 3,8% de Diálisis, Ginecología y Traumatología y un 13,2% de otros servicios como Cardiología, Radiología, Medicina Intensiva y Matrona. Respecto a las muestras, tal y como se detalla en la figura 13, la mayoría eran exudados (50%) y heridas (13%).

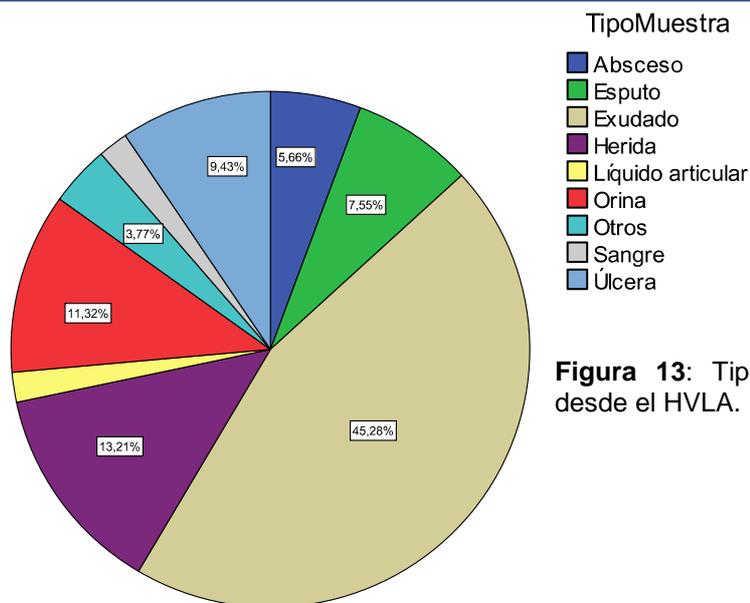


Figura 13: Tipo de muestras remitidas desde el HVLA.

El HGC es un hospital de 3º nivel que desarrolla su actividad en el Departamento de Salud de Castellón, antes denominado Área de Salud 2 de la Comunidad Valenciana, presenta una población de 294.127 habitantes y cuenta con 573 camas.

Del HGC se recibieron 24 muestras procedentes de igual número de pacientes, con una edad media de 59±25 años (rango de 1 mes a 87 años). Respecto al servicio un 21% procedían de Medicina Intensiva, un 21% de Consultas externas, 12,5% Medicina Interna, 12,5% de Cirugía y el 33% restante de Cardiología, Diálisis, Medicina de Familia, Nefrología, Urología y Reumatología. En la Figura 14, se detalla el origen de los aislados por tipo de muestra, destacando que la mayor parte de las muestras recibidas eran de sangre (66,67%).

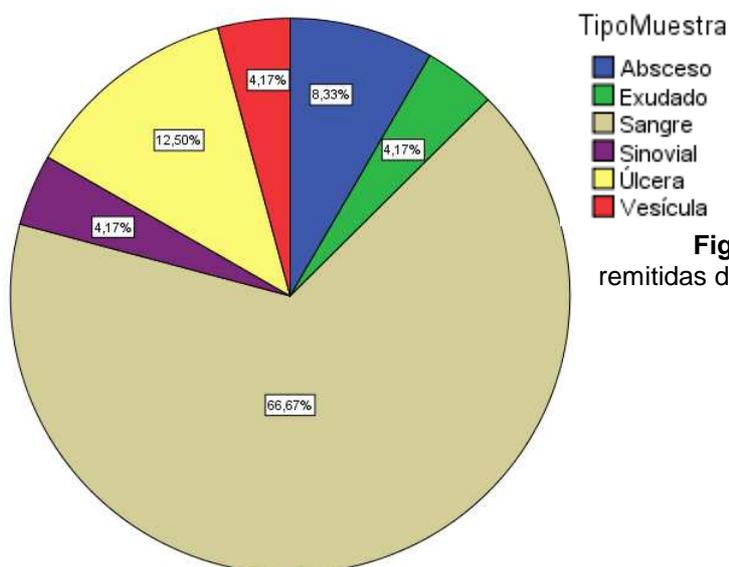


Figura 14: Tipo de muestras remitidas desde el HGC.

3.2. Análisis microbiológico de los aislados

Las muestras se cultivaron en medios Agar sangre y Agar chocolate, y se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 horas.

La identificación presuntiva se confirmaba con una prueba de aglutinación (BD BBL *Staphyloslide Latex Test*) que utiliza partículas de látex revestidas de fibrinógeno humano e IgG, que al mezclarse con colonias de estafilococos que expresan factor de coagulación y proteína A (presentes en *S. aureus*) producen una aglutinación visible (figura 15).

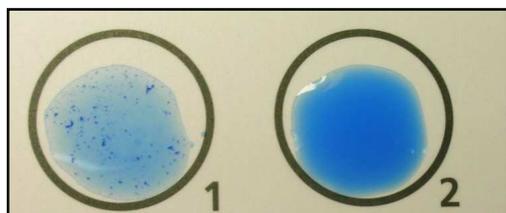


Figura 15: Prueba de aglutinación en látex.

La identificación bioquímica y el estudio de sensibilidad se realizó mediante dos sistemas semiautomatizados: paneles Walkay de Siemens (figura 16) y Vitek2 de Biomèrieux. Los antibióticos estudiados fueron: Amoxicilina-Clavulánico, Ampicilina, Cefazolina, Cefotaxima, Ciprofloxacino, Clindamicina, Eritromicina, Fosfomicina, Gentamicina, Imipenem, Oxacilina, Cefoxitina, Penicilina, Rifampicina, Teicoplanina, Tetraciclina, Trimetoprim/Sulfametoxazol y Vancomicina.

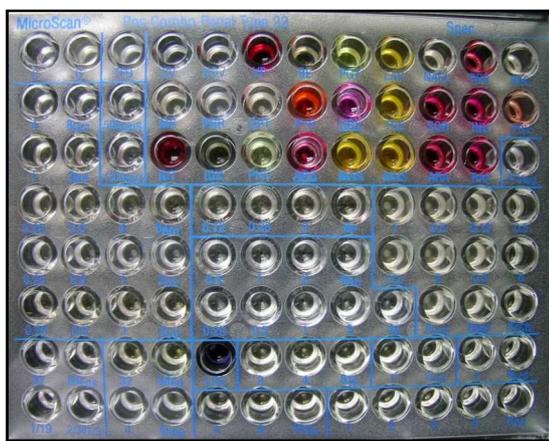


Figura 16: Identificación de *S. aureus* por el método de microdilución en caldo de Siemens.

En las muestras de *S. aureus* procedentes de pacientes hospitalizados, en el momento de detectarse crecimiento, se realizó una prueba rápida para detectar la presencia de PBP2a (Denka Seiken Co; Ltd) y determinar si se trataba de un SARM para adoptar las pertinentes medidas de aislamiento en el caso de que fuera positivo.

3.3. Detección del gen *MecA*

Se realizó en todas las cepas (sensibles y resistentes a meticilina) tras su identificación. La técnica de elección para la detección del gen *mecA* es la amplificación mediante una reacción de PCR (Batista *et al.*, 2008).

Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Geha *et al.* (Geha *et al.*, 1994). La amplificación se realizó con los iniciadores MecA-1 que reconoce los nucleótidos 318 a 342 del gen; y el MecA-2 que reconoce los nucleótidos 603 a 627.

MecA-1	5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CGG ATA A -3'
MecA-2	5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A -3'

Como control interno se emplearon dos iniciadores complementarios de una secuencia universal de ADN ribosomal (Rib-1 y Rib-2) que reconocen los nucleótidos 911 a 930 y 1371 a 1390 del RNA ribosomal 16S respectivamente.

Rib-1	5'-GGA ATT CAA A(T/G, 1:1)G AAT TGA CGG GGG C-3'
Rib-2	5'-CGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC-3'

La técnica consta de 3 partes: extracción del ADN, amplificación e interpretación de los resultados.

La extracción del ADN de *S. aureus* se realizó usando el Kit Genelute Bacterial Genomic DNA (Sigma[®]) de acuerdo con el protocolo del fabricante, añadiendo a las indicaciones un lisado previo con lisostafina (Sigma[®]; 12,5µg/mL) a 37°C durante una hora.

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 5µL de ADN; *mecA-1* y *mecA-2* a una concentración de 50pmol (TIB MOLBIOL[®]); *Rib-1* y *Rib-2* a una concentración de 5pm (TIB MOLBIOL[®]); 2U/µL de Taq-polimerasa; dNTPs a 250µM; buffer a 1x; MgCl₂ a 1,5mM y agua destilada c.s.p. 50µL.

Para la amplificación se definieron en el termociclador (Mastercycler[®]) (Figura 17) los siguientes parámetros: i) un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C de 12 minutos; ii) 30 ciclos comenzando por la desnaturalización a 94°C, durante 45 segundos; el acoplamiento a 55°C durante 45 segundos; y la extensión a 72°C, durante 1 minuto; iii) un ciclo final a 72°C de 2 minutos.



Figura 17: Termociclador.

La eficacia de la reacción de amplificación se comprobaba mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 0,5x (4,84g Tris, Merck; 1,14mL Ácido acético glaciado; 2mL de EDTA, Sigma-Aldrich Co; agua c.s.p. 1 litro) a un voltaje constante de 120V durante 60 minutos (Figura 18). En cada análisis electroforético era incluido un patrón de peso molecular (GeneRuler[™] 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas[®]), con el objeto de comprobar el tamaño de los amplicones obtenidos. Se realizaba con 20 µL del producto de la PCR y 10 µL de tampón de carga LB 2x (Azul de bromofenol, 5g sucrosa, 20 mL agua). El gel era teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta.

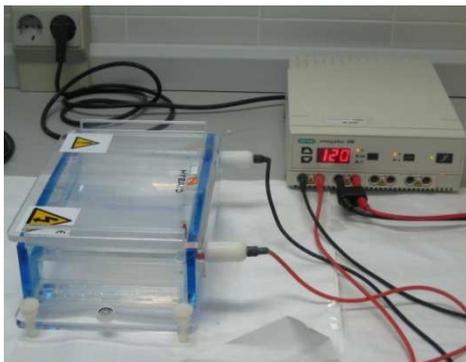


Figura 18: Cubeta de electroforesis.

Las cepas que presentan el gen *mecA*, en el producto de PCR aparece una banda de 310 pb. El control interno de amplificación se visualiza como una banda de 479 pb; esta banda debe aparecer en todas las reacciones.

3.4. Detección de la leucocidina de Panton-Valentine

El estudio de la presencia del gen productor de la Leucocidina de Panton-Valentine (LPV) se realizó en una selección de cepas de adquisición extrahospitalaria. Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Lina y colaboradores (Lina *et al.*, 1999).

La extracción del ADN de *S. aureus* se realizó usando el Kit Genelute Bacterial Genomic DNA (Sigma[®]) de acuerdo con el protocolo del fabricante, añadiendo a las indicaciones un lisado previo con lisostafina (Sigma[®]; 12,5µg/mL) a 37°C durante una hora.

La amplificación se realiza con los iniciadores Luk-PV-1 y Luk-PV-2, obteniéndose un amplificado de 433pb.

Luk-PV-1	5´-ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3´
Luk-PV-2	5´-GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC-3´

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 5µL de ADN, los iniciadores a una concentración de 48 pmol

(TIB MOLBIOL®); 1 U/μL de TaqDNA polimerasa; dNTP a 25μM; buffer a 1x; MgCl₂ a 2 mM y agua destilada c.s.p. 50μL.

Para la amplificación se definieron en el termociclador los siguientes parámetros: i) un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C de 12 minutos; ii) 30 ciclos comenzando por la desnaturalización a 94°C, durante 45 segundos; el acoplamiento a 55°C durante 45 segundos; y la extensión a 72°C, durante 1 minuto; iii) un ciclo final a 72°C de 2 minutos.

La eficacia de la reacción de amplificación se comprobaba mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x a un voltaje constante de 120V durante 1 hora. En cada análisis electroforético era incluido un patrón (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas®), con el objeto de comprobar el tamaño y la posible existencia de más de un fragmento amplificado. Se realizaba con 10 μL del producto de la PCR y 10 μL de tampón de carga LB 2x. El gel era teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta.

Las cepas que tienen el gen *luk-PV*, presentan una banda de 433pb en el producto de PCR.

3.5. Estudio genotípico de los aislados

La caracterización genotípica de los aislados se realizó mediante Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y mediante Electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsátil (PFGE).

3.5.1. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Se llevó a cabo en todas las cepas seleccionadas, tras su identificación.

La extracción del ADN de *S. aureus* se realizó usando el mismo protocolo descrito en el apartado 3.3.

El tipado molecular se basó en el análisis de las regiones polimórficas de los genes *coa*, *spa* y *clfB*.

3.5.1.1 Técnica PCR-RFLP para el gen de la coagulasa

Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Hookey y colaboradores (Hookey *et al.*, 1998).

La amplificación se realizó con los iniciadores *coa* 1m que reconoce los nucleótidos 1513 a 1531 del gen de la coagulasa; y el *coa* 2c que reconoce los nucleótidos 2188 a 2186.

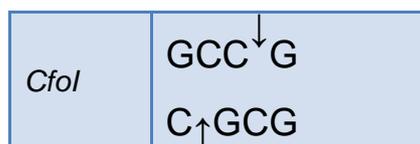
<i>coa</i> 1m	5'-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3'
<i>coa</i> 2c	5'-GCT TCC GAT TGT TCG ATG C-3'

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 1µL de ADN (100ng); 0,5 µL de cada iniciador (100pmol) (TIB MOLBIOL[®]); 0,5 µL de Taq 1U/µL; 0,5 µL de dNTP 200µM; buffer a 1x; 1 µL de MgCl₂ 1mM y agua destilada c.s.p. 25µL.

Para la amplificación, se definieron en el termociclador los siguientes parámetros: i) un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C de 4 minutos; ii) 30 ciclos comenzando por la desnaturalización a 94°C, durante 20 segundos; el acoplamiento a 57°C durante 15 segundos; y la extensión a 72°C, durante 50 segundos; iii) un ciclo final a 72°C de 5 minutos.

La eficacia de la reacción de amplificación se comprobaba mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1x a un voltaje constante de 120V durante 2 horas. En cada análisis electroforético se incluyó un patrón, con el objeto de comprobar el tamaño y la posible existencia de más de un fragmento amplificado. Se realizaba con 5 µL del producto de la PCR y 5 µL de tampón de carga LB 2x. El gel se teñía con bromuro de etidio y visualizaba con luz ultravioleta.

Para realizar el análisis del polimorfismo del gen de la coagulasa, aproximadamente 500ng del producto de la PCR, precipitado con etanol/acetato, se sometió a una reacción de digestión enzimática con 5U de la endonucleasa *CfoI* (Roche) a 37°C durante 2 horas. La enzima *CfoI* reconoce y corta la siguiente secuencia:



Los fragmentos obtenidos tras el tratamiento con la endonucleasa fueron separados mediante electroforesis horizontal junto con el marcador de peso molecular, de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Preparación del gel: Un volumen de agarosa al 2,5% en tampón TAE 1x, con bromuro de etidio al 0,005% (p/v), era depositado sobre la bandeja portageles (figura 19), colocada sobre una superficie nivelada, y antes de la gelificación se insertaba el peine para formar los correspondientes pocillos.

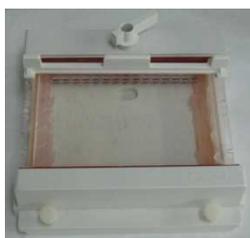


Figura 19: Bandeja portageles.

- Preparación de las muestras: Las muestras digeridas y los controles eran diluidos con tampón de carga (azul de bromofenol) y depositados en los pocillos del gel que estaba, sumergido en TAE, en el interior de la cubeta de electroforesis.
- Separación electroforética y visualización: Las muestras fueron sometidas a migración electroforética con un voltaje constante de 120V durante 2,5 horas, momento en el que el azul de bromofenol había alcanzado el extremo opuesto del gel. Tras lo cual, el gel

era depositado sobre el transiluminador de luz ultravioleta y la imagen era fotografiada mediante un sistema de captación de imágenes.

3.5.1.2 Técnica PCR –RFLP para el gen de la Proteína A

Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Viana y colaboradores (Viana *et al.*, 2007).

El gen de la proteína A está compuesto por aproximadamente 2150 pb y alberga varias regiones funcionales: la región de unión Fc, la región X y la región C Terminal (secuencia necesaria para poder infectar a las células). La región de unión Fc está compuesta por cinco repeticiones de 160 pb. La región X contiene un número variable de repeticiones de 24 pb. Esta región repetitiva con un gran polimorfismo es la que se amplifica por PCR.

La amplificación se realiza con los iniciadores Spa 1m y el Spa 2c:

Spa 1m	5'-GAT TTT AGT ATT GCA ATA CAT AAT TCG-3'
Spa 2c	5'-CCA CCA AAT ACA GTT GTA CCG-3'

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 1µL de ADN (100ng); 0,5 µL de cada iniciador (100pmol) (TIB MOLBIOL®); 0,5 µL de Taq 1U/µL; 0,5 µL de dNTP 200µM; buffer a 1x; 1 µL de MgCl₂ 1mM y agua destilada c.s.p. 25µL.

Para la amplificación, se definieron en el termociclador los siguientes parámetros: i) un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C de 4 minutos; ii) 40 ciclos comenzando por la desnaturalización a 94°C, durante 20 segundos; el acoplamiento a 50°C durante 20 segundos; y la extensión a 72°C, durante 1 ½ minutos; iii) un ciclo final a 72°C de 5 minutos.

Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X.

Para la restricción enzimática se empleó la misma endonucleasa y el mismo protocolo que para el gen de la coagulasa.

3.5.1.3 Técnica PCR para el gen del Clumping factor B

Se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Koreen y colaboradores (Koreen *et al.*, 2005).

El gen *Clumping factor B (clfB)* de *S. aureus* codifica una proteína que se une al fibrinógeno y la queratina facilitando la colonización de *S. aureus*. Además, el *clfB* contiene una elevada variabilidad de regiones repetitivas de serina-aspartato (SD).

La amplificación se realiza con los iniciadores ClfB 1m y ClfB 2c:

ClfB 1m	5'-CAG CAG TAA ATC CGA AAG ACC C-3'
ClfB 2c	5'-CAC CTT TAG GAT TTG ATG GTG C-3'

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 1µL de ADN (100ng); 0,5 µL de cada iniciador (100pmol); 0,5 µL de Taq 1U/µL; 0,5 µL de dNTP 200µM; buffer a 1x; 1 µL de MgCl₂ 1mM y agua destilada c.s.p. 25µL.

Para la amplificación, se definieron en el termociclador los siguientes parámetros: i) un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C de 2 minutos; ii) 30 ciclos comenzando por la desnaturalización a 94°C, durante 20 segundos; el acoplamiento a 56°C durante 20 segundos; y la extensión a 72°C, durante 1 minuto; iii) un ciclo final a 72°C de 5 minutos.

El producto de la PCR fue separado mediante electroforesis horizontal junto con el marcador de peso molecular en gel de agarosa al 2%, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

3.5.2 Electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE)

Se llevó a cabo en todas las cepas seleccionadas, tras su identificación.

3.5.2.1 Proceso de extracción

Se sembraron las cepas de *S. aureus* en placas de agar chocolate y se incubaron durante 24 horas en estufa de CO₂ a 37°C. Una vez crecidas, se inoculó una colonia en 1 mL de caldo de cultivo BHI (Infusión cerebro-corazón) (Biomedix®) y se incubó toda la noche a 37°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de TE pH 8 (10mM Tris-HCl, Merck; 1 mM EDTA, Sigma-Aldrich Co). Se lavó una vez con TE, y finalmente se volvió a centrifugar (10 min a 13000 rpm) y se resuspendió en 200 µL de TE.

Para la preparación de la agarosa al 1,8 % (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), se disolvió en TBE 0.5X (0.045M Tris-Borato, Merck; 1mM EDTA, Sigma-Aldrich Co) mediante calentamiento en microondas hasta su completa disolución; y se mantuvo la agarosa en un baño a 50°C hasta el momento de mezclar con la suspensión bacteriana.

Para la formación de los bloques, se mezclaron 200 µL de la suspensión bacteriana, con un volumen igual de agarosa. Rápidamente, para evitar que se solidificara, se cargaron 2 moldes (Plug Mold, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) (Figura 20) para cada cepa y se dejaron enfriar durante 10-15 minutos.



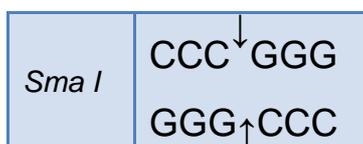
Figura 20: Moldes empleados en la PFGE.

Una vez solidificados los bloques, se extrajeron de los moldes y se colocaron en tubos universales a los que previamente se había añadido 1 mL de tampón de lisis EC (6mM Tris-HCl pH8, Merck; 1M NaCl, Panreac; 100mM EDTA, Sigma-Aldrich Co; Brij 58 0,5%, Sigma-Aldrich Co; Sarcosyl 0,5%, Sigma-Aldrich Co; Ácido desoxicólico 0,2%, Sigma-Aldrich Co; 50 µg/mL Lisostafina, Sigma-Aldrich Co; 100 µg/mL Lisozima, Sigma-Aldrich Co). Se incubaron a 37°C durante 4 horas, pasadas las cuales la solución de lisis fue sustituida por una solución de proteólisis ES (0.5M EDTA pH 9,5, Sigma-Aldrich Co; Sarcosyl 1%, Sigma-Aldrich Co; 50mg/mL proteinasa K, Sarcosyl 0,5%, Sigma-Aldrich Co). En esta solución se incubaron los bloques de agarosa 18 horas a 50°C.

Una vez finalizado el proceso de lisis, se retiró el tampón y se realizaron 2 lavados con TE de 10 minutos a 56°C en agitación; y un tercer lavado con TE de 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. Al finalizar el proceso, se conservaron con TE a 4°C para su posterior uso.

3.5.2.2 Restricción del ADN

La digestión enzimática se produce en el mismo bloque de agarosa ya que la enzima de restricción difunde a través de él. Se utilizan endonucleasas de baja frecuencia de corte, lo que permite digerir el ADN cromosómico en fragmentos grandes. La enzima *Sma I* reconoce y corta la siguiente secuencia:



El proceso de digestión con la endonucleasa de restricción *Sma I* (Roche) comenzó con el preequilibrado de los bloques mediante la incubación de cada uno de ellos con 100 µL de tampón de restricción 1X (tampón comercial que acompaña a la enzima), manteniéndose en la nevera a 4°C durante 30 minutos. Tras este paso, se añadió al tampón de digestión, el enzima *Sma I* a 10 unidades por reacción y se incubaron a 37° C, durante 4 horas. El proceso de digestión finalizó con la retirada del tampón y la adición de

1 mL de TE dejando la suspensión a 4°C durante 30 minutos antes de iniciar la electroforesis.

3.5.2.3 Electroforesis de los fragmentos de restricción

Al finalizar el proceso de lisis, se retiró el tampón y se realizaron 2 lavados con TE de 10 minutos a 56°C en agitación; y un tercer lavado con TE de 10 minutos a temperatura ambiente en agitación. Una vez finalizado el proceso, se conservaron con TE a 4°C hasta su uso.

Para la electroforesis se utilizó el sistema Contour Clamped Homogeneous Electric Field (Chef-DR[®] III Pulsed Field Electrophoresis Systems, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (figura 21).



Figura 21: Chef-DR[®] III.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- Se preparó la agarosa al 1.2% (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad Laboratorios, Hercules CA) en solución TBE 0,5X calentando en microondas hasta su completa disolución, manteniéndola en baño a 50°C para evitar que solidifique.
- Se montó el sistema de formación del gel (soporte y moldes formadores del gel) y posteriormente se añadió la agarosa (Bio-Rad), dejándola solidificar y reservando un poco de agarosa caliente (unos 5 mL) para sellar los bloques.
- Una vez solidificado el gel, se dispusieron los bloques digeridos sobre cada uno de los huecos que dejó el peine. Se colocó además un bloque con el marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFGE MarkerTM New England Biolabs, Izasa).

- Se sellaron los pocillos con la agarosa reservada y se dejó solidificar.
- Se añadieron a la cubeta 2 litros de tampón TBE 0.5X y se colocó el gel en el marco correspondiente.
- Finalmente se ajustaron las condiciones de electroforesis con un voltaje de 6V/cm y una temperatura de 14°C:
 - 1º Rampa: 5-15 segundos → Tiempo: 10 horas.
 - 2ª Rampa: 15-60 segundos → Tiempo: 13 horas.
- Tras finalizar la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) (Sigma-Aldrich Co) durante 30 min.
- Se visualizó el gel mediante transiluminación con luz ultravioleta. (Spectroline Transilluminator model TC-312 A, spectronics Corporation, Westbury) y las imágenes fueron fotografiadas mediante un sistema de captación de imágenes (DC290 Zoom Digital Camera, Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

3.5.2.4 Interpretación de los resultados

El tamaño relativo de los fragmentos fue calculado según el protocolo del software Bio-Profil Bio 1D++ (Vilver Lourmat[®]). Una vez normalizados los geles se seleccionaron las líneas a comparar y se calculó la similitud entre los aislados según el Coeficiente de Dice que se basa en la coincidencia en el tamaño de las bandas. Cuando se ha definido la totalidad de bandas presentes, se determina su presencia o ausencia en cada una de las cepas y el coeficiente de similitud se calcula con la siguiente fórmula:

$$S_D = \frac{2n_{AB}}{2n_{AB} + a + b}$$

n_{AB} = número de bandas presentes en las dos cepas.

a = número de bandas presentes en la cepa A pero no en la cepa B.

b = número de bandas presentes en la cepa B pero no en la cepa A.

Para crear el dendograma de homología se empleó el programa Bio-Profil Bio 1D++, que permite la agrupación de los aislados en función del nivel de similitud, mediante las comparaciones de los tamaños moleculares (UPGMA, unweighted pair group mathematical average) con un valor de tolerancia para el ajuste del 1.0% y de optimización del 0.5%; y la obtención de un dendograma de homología. Los dendogramas generados con los marcadores moleculares no hay que considerarlos como una representación filogenética de las relaciones entre cepas, sino como una forma práctica de visualizar el grado de relación entre cepas e identificar grupos.

Los datos se analizaron paralelamente con el paquete estadístico SPSS 19.0 para Windows, aplicando igualmente el Coeficiente de Dice, y obteniendo matrices y dendogramas de homología.

Para establecer el grado de relación existente entre las cepas a partir de los resultados obtenidos por PCR-RFLP y PFGE se aplicaron los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995). De modo que los aislados que presentaban un coeficiente de similitud entre el 70% (cepas estrechamente relacionadas) y el 100% (cepas idénticas) eran incluidos en el mismo patrón. Si la homología oscilaba entre el 50% y el 70% eran considerados como posiblemente relacionados, y como no relacionados si su similitud era inferior al 50%.

3.5.3 Evaluación del poder de discriminación del PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) como método de tipado frente al PFGE

Una vez analizados los perfiles obtenidos para la totalidad de los aislados, se aplicó la fórmula que calcula el Índice de Diversidad de Simpson que permite evaluar el poder de discriminación de una técnica y establecer comparaciones con las técnicas de referencia (Hunter and Gaston, 1988).

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

D= Índice de diversidad de Simpson.
 N= número total de cepas de la muestra;
 S= número total de tipos descritos;
 n_j= número de cepas pertenecientes al tipo J.

Se define el Poder discriminativo como la probabilidad promedio de que el marcador utilizado clasifique en 2 tipos distintos a 2 cepas no relacionadas escogidas al azar de la población de un determinado taxón. El valor de D depende del número de tipos distintos definidos por el marcador y de la homogeneidad con la que la población estudiada se distribuye en los “n” tipos. Idealmente el valor de D debe ser superior a 0,95.

3.6. Estudio de la concordancia entre métodos para la detección del brote de SARM en el Servicio de Medicina Intensiva

Estudiados los aislados mediante los dos métodos de genotipado, calculamos la concordancia entre ambos mediante el índice kappa con el paquete estadístico SPSS 19.0. Este índice determina si la concordancia observada entre métodos es superior a la que se esperaría obtener por puro azar y se define como:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde P_o corresponde a la proporción de concordancia observada y P_e es la proporción de concordancia esperada por puro azar. Por tanto, la máxima concordancia posible corresponde a κ = 1, el valor κ = 0 se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar, y si la concordancia es mayor que la esperada, κ > 0,

Material y Métodos

mientras que si es menor, $\kappa < 0$. Para interpretar su valor Landis y Koch (Landis and Koch, 1977) propusieron unos márgenes que valoran el grado de acuerdo:

Valor de κ	Fuerza de la concordancia
0,01-0,20	Pobre
0,21-0,40	Débil
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Buena
0,81-1,00	Muy buena

4. Resultados

4.1. Datos demográficos, clínicos y epidemiológicos

4.1.1 Hospital Universitario La Ribera

4.1.1.1 Procedencia de los aislados

Los 129 aislados incluidos en el estudio procedían de 120 pacientes, de los cuales un 61% fueron varones y 39% mujeres. La edad oscilaba entre los 2 días y los 91 años; con una media de $55 \pm 23,61$ años (figura 22).

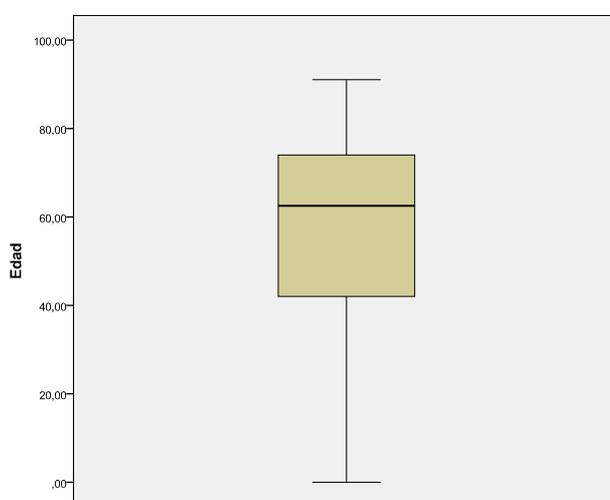


Figura 22: Diagrama de caja que refleja la edad media de la población.

De acuerdo con los criterios establecidos se consideraron 61 aislados de adquisición nosocomial, 29 infecciones asociadas a cuidados sanitarios y 39 comunitarios.

Las muestras de adquisición nosocomial (tabla 7) procedían mayoritariamente de Medicina Intensiva con un 36,1%, un 27,9% de Medicina Interna, un 4,9% de Traumatología, un 6,6% de Cirugía, un 8,2% de Neurocirugía, un 4,9% de Pediatría y el resto, un 11,4%, de otros servicios (Angiología, Medicina preventiva, Nefrología, Urología y Psiquiatría).

Resultados

	Cirugía	M.Intensiva	M.Interna	Neurocirugía	Pediatría	Traumatología	Otros	Total
Absceso			1			1	2	4
Aspirado traqueal	1	8		1				10
BAS		8	2				1	11
Biopsia						2		2
Espuito			3					3
Exudado herida	1	1	3		1		2	8
Exudado peritoneal	1							1
Exudado úlcera			2					2
LCR				2				2
Sangre	1	5	6	2	2		2	18
Total	4	22	17	5	3	3	7	61

Tabla 7: Relación entre el tipo de muestra y servicio de procedencia de los aislados nosocomiales. BAS: broncoaspirado y LCR: líquido cefalorraquídeo. Se destacan muestras de sangre y las procedentes de Medicina Intensiva.

Destacar que el elevado porcentaje de muestras procedentes del servicio de Medicina Intensiva se concentraron durante los meses de julio a septiembre de 2007, con un nuevo repunte en diciembre que se mantuvo hasta febrero de 2008, y que se debió a un brote epidémico ocurrido en este servicio durante este periodo.

En cuanto a las muestras de adquisición comunitaria provenían en un mayor porcentaje de Consultas externas (Angiología, Cirugía, Dermatología, Endocrinología, Geriátrica, Oftalmología y Traumatología) con un 49,8%; un 31,6% de Urgencias, un 15,4% de Medicina de Familia y un 3,2% de Pediatría. Respecto al tipo de muestra predominaron las úlceras con un 28% (11/39) y los abscesos con un 18% (7/39).

La mayoría de las muestras de IACS provenían de Nefrología (37,9%), seguido con un 27,6% de Urgencias, un 3,4% de Medicina de Familia y un 31,1% de otros servicios (Angiología, Cirugía, Hematología, Medicina Interna, Neurocirugía, Radiodiagnóstico y Traumatología). En cuanto al tipo de muestra del que se aislaron las cepas, predominaron las muestras de sangre con un 20,7% (6 de 29) y las úlceras con el mismo porcentaje.

4.1.1.2 Intervalo entre el ingreso y la adquisición

El intervalo entre el ingreso y la adquisición de *S. aureus* se estudió en todos los casos para establecer si la adquisición era nosocomial, como así se demostró en 61 casos. La media global del tiempo de hospitalización fue de 21 ± 24 días con un rango de 1 a 95 días. En los casos en los que se diagnosticó un *S. aureus* sensible a meticilina (26 casos) el intervalo medio fue de $7 \pm 7,4$ días (rango de 1 a 31 días) y en aquellos en los que se trataba de un SARM (35 casos) el intervalo medio fue de $31 \pm 26,8$ días (rango de 1 a 95 días).

4.1.1.3 Enfermedades crónicas de base

Un 72,5% de los pacientes (87 de 120) presentaban una enfermedad crónica de base. Las más frecuentes fueron las neoplasias (13%), seguidas por diabetes mellitus (7,4%), accidentes cerebro-vasculares (5,7%) e insuficiencia cardíaca (5%).

4.1.1.4 Factores extrínsecos predisponentes

Un 47,5% de los pacientes (57 de 120) presentaban factores extrínsecos que podían predisponer a la infección por *S. aureus*. En los casos de adquisición nosocomial, la más frecuente fue el uso de antibioterapia de amplio espectro (70%), seguida por la presencia de catéter endovascular (42%), sondaje vesical (23%) e intubación endotraqueal (21%). En los pacientes incluidos en el grupo de IACS la presencia de catéter de diálisis crónico (52%) fue el principal factor de riesgo.

4.1.1.5 Colonización e Infección

A pesar de las dificultades para diferenciar entre colonización e infección, el 94% de los aislados se consideraron infecciones ya que cumplían criterios clínicos, es decir, se trataba de aislamientos únicos y en localizaciones habitualmente estériles. La excepción la constituyen aislados relacionados con

Resultados

pacientes del grupo de IACS (todos ellos SASM) en los que no siempre se pudo definir con claridad este criterio.

Un 14% de los pacientes presentaron más de un aislamiento. El tiempo medio entre el último aislamiento y el inmediatamente anterior fue de 65 ± 71 días (rango de 10 a 238 días). En un 29% de los casos no hubo coincidencia entre ambos aislamientos respecto a la resistencia del *S. aureus* a la meticilina, por lo que se consideraron como nuevos episodios.

4.1.1.6 Tratamiento y evolución del paciente

De los 74 pacientes en los que se aisló SASM, en 50 de ellos se registró en la historia clínica el tratamiento administrado. Con independencia del origen y del tipo de muestra se prefirieron los β -lactámicos y las fluorquinolonas (30% y 18% respectivamente); reservando la vancomicina para procesos invasivos y tratamientos hospitalarios. El linezolid se utilizó en un paciente con bacteriemia (tabla 8).

ORIGEN	TIPO DE MUESTRA	AMG	Lactámico	Linezolid	FQ	Vancomicina	Lincosamidas	TOTAL
Extrahospitalario	Absceso		1		2			3
	Biopsia				1			1
	Exudado herida	1	5					6
	Exudado peritoneal		1					1
	Exudado úlcera		3		2		1	6
	PAAF						1	1
	Raspado corneal				1			1
	Sangre		1		1			2
IACS	Absceso				1			1
	Exudado catéter					1		1
	Exudado herida				3			3
	Exudado úlcera		2				1	3
	Líquido sinovial	1	1					2
Nosocomial	Absceso		2				1	3
	Aspirado traqueal		1		1			2
	BAS		1			1		2
	Biopsia		1					1
	Exudado herida		1					1
	LCR					2		2
	Sangre		4	1	1	2		8
TOTAL		2	24	1	13	6	4	50

Tabla 8: Aislados de SASM. Tratamiento de elección en función del origen y el tipo de muestra. PAAF: Punción aspiración con aguja fina. BAS: Broncoaspirado. LCR: Líquido cefalorraquídeo. AMG: Aminoglucósido. FQ: Fluorquinolona.

En el caso de los 46 pacientes infectados por SARM, una vez conocida la resistencia a β -lactámicos, predominó la utilización de linezolid (25,6%) y de vancomicina (15,3%) (tabla 9). En 7 de los pacientes no constaba el tratamiento empleado.

ORIGEN	TIPO DE MUESTRA	Lactámico	Linezolid	FQ	Vancomicina	Lincosamidas	TOTAL
Extrahospitalario	Absceso			1		1	2
	Exudado ótico	1					1
	Exudado úlcera	1					1
IACS	Absceso	1					1
	Exudado úlcera			1			1
	Líquido sinovial				1		1
	Sangre	2			1		3
Nosocomial	Absceso		1				1
	Aspirado traqueal		5		1		6
	BAS	4	1		1		6
	Biopsia	1					1
	Espujo	3					3
	Exudado herida	2	1		1		4
	Exudado peritoneal				1		1
	Exudado úlcera			1			1
	Sangre	4	2				6
TOTAL		19	10	3	6	1	39

Tabla 9: Aislados de SARM. Tratamiento de elección en función del origen y el tipo de muestra. BAS: Broncoaspirado. FQ: Fluorquinolona.

Respecto a la evolución, el 93% de los pacientes recibieron el alta, un 1% fueron trasladados a otros hospitales por lo que desconocemos si hubo o no resolución de la infección, y fueron *exitus* un 6% (7 pacientes); de los cuales cinco estaban infectados por SARM.

4.2 Datos microbiológicos

4.2.1 Hospital Universitario La Ribera

4.2.1.1 Porcentaje de resistencia a meticilina

Un 41,1% de las cepas incluidas en el estudio se mostraron resistentes a meticilina en los estudios de sensibilidad (figura 24) con una concentración mínima inhibitoria (CMI) para la oxacilina mayor a 2 mg/mL. Este porcentaje corresponde en un 27,7% a aislados e origen nosocomial, un 7,9% a IACs y un 5,5% para los extrahospitalarios.

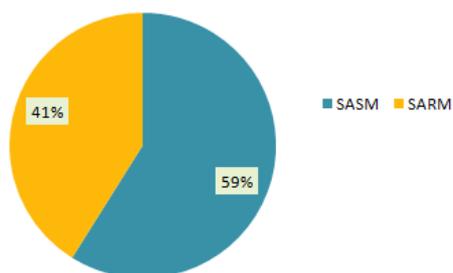


Figura 23: Porcentaje de resistencia a meticilina.

La resistencia a meticilina se confirmó mediante la detección del gen *mecA* por PCR (figura 24). En todas las cepas con fenotipo de resistencia a meticilina, en el producto de PCR se observa una banda de 310pb correspondiente al gen *mecA* y una banda a 479pb que corresponde al control interno de amplificación.

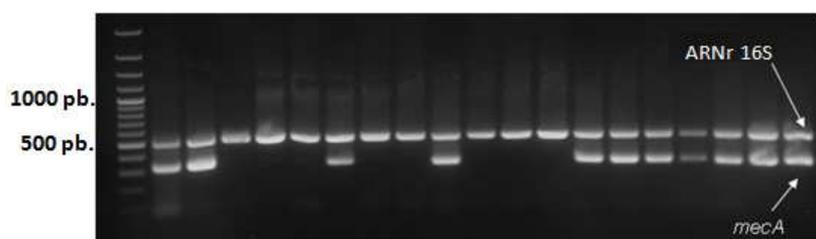


Figura 24: Resultado de PCR del gen *mecA*. Primera carrera se corresponde con el control de peso molecular (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder de Fermentas®). En los carriles que muestran dos bandas, la superior se corresponde con el control interno y la inferior a la amplificación del gen *mecA*. Control negativo (cepa CCGU 47167).

En las 76 cepas consideradas SASM en los estudios fenotípicos, con una CMI de oxacilina comprendida entre 0,25 y 2 mg/mL y sensibles también a cefoxitina, en dos de ellas (2,6%) se detectó el gen *mecA*. Estos aislados, que reciben el nombre de OS-SARM (oxacilin sensibles SARM), habían sido aislados de 2 abscesos de pacientes distintos procedentes de la comunidad.

4.2.1.2 Resistencia antibiótica

Una vez diferenciados los aislados como SARM o SASM, el mayor porcentaje de resistencia se encontró frente a ciprofloxacino, alcanzando el 91% entre los aislados SARM nosocomiales; seguido de la resistencia a eritromicina y clindamicina (incluyendo resistencias directas e inducidas). La

resistencia a gentamicina únicamente fue destacable entre las cepas SARM extrahospitalarias con un 14,3%, y para el cotrimoxazol en cepas SARM procedentes de pacientes IACS, con un 10%. Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina y linezolid. En la tabla 10, aparece el porcentaje de resistencia a los diferentes grupos de antibióticos testados, en función de su origen y de la sensibilidad a metilicina.

	NOSOCOMIAL (%)		IACS (%)		EXTRAHOSP (%)	
	SASM (42,6)	SARM (57,4)	SASM (65,5)	SARM (34,5)	SASM (82,1)	SARM (17,9)
Resistencia a metilicina						
ERITROMICINA	38,5	88,6	31,6	70,0	31,3	42,9
CLINDAMICINA	3,8	80,0	0,0	60,0	3,1	14,3
GENTAMICINA	0,0	3,8	5,3	0,0	3,1	14,3
CIPROFLOXACINO	15,4	91,4	15,8	70,0	6,3	57,1
RIFAMPICINA	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
COTRIMOXAZOL	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
FOSFOMICINA	3,8	0,0	0,0	10,0	0,0	28,6
VANCOMICINA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
LINEZOLID	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 10: Porcentaje de resistencia a los diferentes grupos de antibiótico testados en función de su origen.

Se estudió para cada una de las cepas su patrón de resistencia en función de la resistencia que presentaban a los antibióticos siguientes: eritromicina (ERY), clindamicina (CLIN), gentamicina (GEN), ciprofloxacino (CIP), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF), cotrimoxazol (SXT), fosfomicina (FOS) y vancomicina (VAN).

En las cepas de SASM (77 aislados) se obtuvieron 11 patrones de resistencia diferentes codificados con las letras PR seguido del número de orden como se muestran en la tabla 11. La mayoría de las cepas, el 58% (45

Resultados

cepas) se mostraron sensibles a todos los antibióticos testados. La frecuencia con la que se encuentran los PRs es variable: en 8 PRs el número de aislamientos es de 1 (PR3, PR5, PR6, PR7, PR8, PR9, PR10, PR11), en 1PR el número de aislamientos es de 3 (PR4), en 1PR de 4 (PR2) y en otro PR (PR1) de 17 aislamientos.

PATRÓN DE RESISTENCIA	COMPOSICIÓN:	Nº Cepas (%)
PR1-SASM	ERY	17 (22,1%)
PR2-SASM	CIP	4 (5,2%)
PR3-SASM	GEN	1 (1,3%)
PR4-SASM	CIP, ERY	3 (3,9%)
PR5-SASM	CIP, GEN	1 (1,3%)
PR6-SASM	ERY, GEN	1 (1,3%)
PR7-SASM	ERY, CLIN	1 (1,3%)
PR8-SASM	ERY, TET	1 (1,3%)
PR9-SASM	ERY, RIF	1 (1,3%)
PR10-SASM	ERY, FOS, GEN	1 (1,3%)
PR11-SASM	ERY, CLIN, CIP	1 (1,3%)

Tabla 11: Fenotipos de resistencia de las cepas SASM. Patrón de resistencia (PR), ciprofloxacino (CIP), eritromicina (ERY), clindamicina (CLIN), gentamicina (GEN), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF).

En los SARM (52 cepas) se obtuvieron 10 patrones de resistencia diferentes que se muestran en la tabla 12. Un 7,7% (4) de las cepas eran resistentes únicamente a los β -lactámicos. La frecuencia de los PRs es, para el caso de los SARM: 6PRs con 1 aislamiento (PR3, PR5, PR6, PR7, PR9, PR10), 1PR con 2 aislamientos (PR1), 2PRs con 4 aislamientos (PR2, PR4) y 1PR con 32 aislamientos (PR8).

Se define una cepa multiresistente como aquella resistente a oxacilina y, al menos, a otros dos grupos de antibióticos distintos de los β -lactámicos

(Szabo *et al*, 2009); por lo que al estudiar la resistencia de los 52 aislados de SARM, el 79% (41 cepas) resultaron multirresistentes. El patrón de multirresistencia mayoritario fue la resistencia a β -lactámicos unida a ciprofloxacino, clindamicina y eritromicina (61,5% de los casos), seguido de β -lactámicos más ciprofloxacino y eritromicina (7,7%).

PATRÓN DE RESISTENCIA	COMPOSICIÓN: β -lactámicos +	Nº Cepas (%)
PR1-SARM	ERY	2 (3,8%)
PR2-SARM	CIP	4 (7,7%)
PR3-SARM	FOS	1 (1,9%)
PR4-SARM	CIP, ERY	4 (7,7%)
PR5-SARM	CIP, CLIN	1 (1,9%)
PR6-SARM	FOS, TET	1 (1,9%)
PR7-SARM	ERY, CIP, GEN	1 (1,9%)
PR8-SARM	ERY, CIP, CLIN	32 (61,5%)
PR9-SARM	CLIN, ERY, SXT	1 (1,9%)
PR10-SARM	CIP, CLIN, ERY, FOS	1 (1,9%)

Tabla 12: Fenotipos de resistencia de cepas SARM. Patrón de resistencia (PR), ciprofloxacino (CIP), eritromicina (ERY), clindamicina (CLIN), gentamicina (GEN), fosfomicina (FOS), tetraciclina (TET), rifampicina (RIF).

4.2.2 Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), Hospital Virgen de los Lirios de Alcoy (HVL) y Hospital General de Castellón (HGC)

4.2.2.1 Porcentaje de resistencia a meticilina

De los aislados seleccionados por cada uno de los hospitales que colaboraron en el estudio, el porcentaje total de resistencia a meticilina fue del 45% en el caso del HCUV (22 de 49), 17% para el HVLA (9 de 53) y 79% en el HGC (19 de 24).

La resistencia a meticilina se confirmó en todos los casos mediante la detección del gen *mecA* por PCR. En todas las cepas con fenotipo de resistencia a la meticilina, en el producto de PCR se observó una banda de 310pb y la banda correspondiente al control; los aislados sensibles a meticilina únicamente mostraron la banda correspondiente al control. No se detectaron cepas OS-SARM.

4.3 Estudio de la producción de Leucocidina de Pantón Valentine

El estudio de la presencia del gen productor de la Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) se realizó en una selección de muestras que por su procedencia (exudados y abscesos) y origen (extrahospitalario o IACs) fuesen candidatas a producir LPV.

Se estudiaron un total de 108 cepas, y se incluyó una cepa control productora de leucocidina procedente de la colección de cultivos tipo de Göteborg (CCGU 471676). La amplificación fue positiva en dos de ellas ya que presentaron la banda de 433pb del gen *Luk-PV* en el producto de PCR (Figura 25). Una de ellas se aisló en HUR de una muestra de absceso obtenida de cirugía; tratándose de una cepa de SARM de adquisición extrahospitalaria. La otra cepa, también SARM, se aisló en el HVLA de un absceso de pediatría.

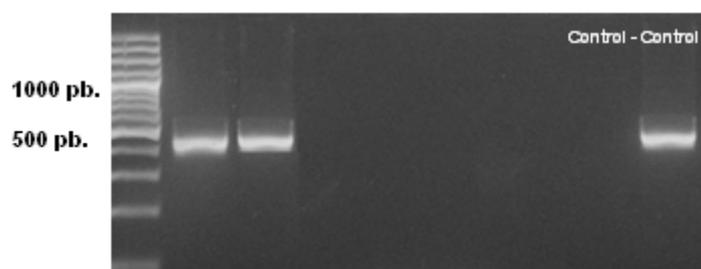


Figura 25: Resultado de PCR del gen *Luk-PV*. Primer carril marcador de PM, segundo y tercer carril aislados positivos. El octavo carril corresponde al control negativo y el último al positivo (cepa CUG 471676) que muestra el amplificado con un tamaño de banda de 433pb.

4.4 Datos genotípicos

4.4.1 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

El análisis genotípico mediante PCR-RFLP se realizó en las 255 cepas incluidas en el estudio, procedentes de los diferentes Departamentos de Salud.

4.4.1.1 Patrones PCR-RFLP obtenidos para la coagulasa

La amplificación de la región de ADN comprendida entre los cebadores coa 1m y coa 2c permitió la detección de 1 fragmento en todas las muestras de tamaño comprendido entre 400 y 900 pb, diferenciando 6 patrones diferentes (A, B, C, D, F, G) que se muestran en la figura 26.

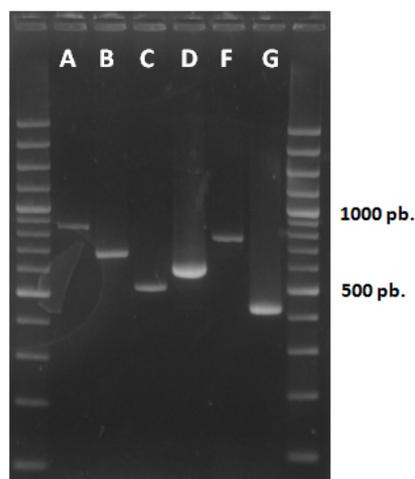


Figura 26: Amplificación por PCR del gen de la coagulasa. Los diferentes productos de PCR (A-G) aparecen señalados entre los carriles 1 y 8 correspondientes al control PM.

Al analizar los resultados, los perfiles más frecuentes fueron los patrones C en un 47% de los casos (119 de 255 cepas), seguido de B (26%) y de D (23%). En todos los hospitales el patrón C fue el mayoritario, excepto en el HVLA en el que fue el patrón B, como se aprecia en la figura 27.

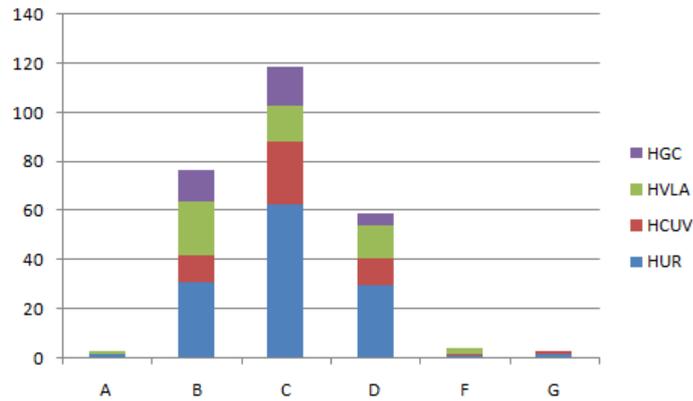


Figura 27: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de coagulasa para cada uno de los hospitales.

Cuando el producto de la PCR se digiere con la endonucleasa *CfoI* se obtienen de 1 a 5 fragmentos de tamaño comprendido entre 100 y 500 pb. Al separar los fragmentos resultantes por electroforesis en gel de agarosa obtenemos 32 patrones de digestión (A₁, B₁, B₂, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₉, B₁₀, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, D₆, D₇, D₈, D₉, D₁₀, F₁, F₃, G₁, G₂, G₃) que se muestran en la figura 28.

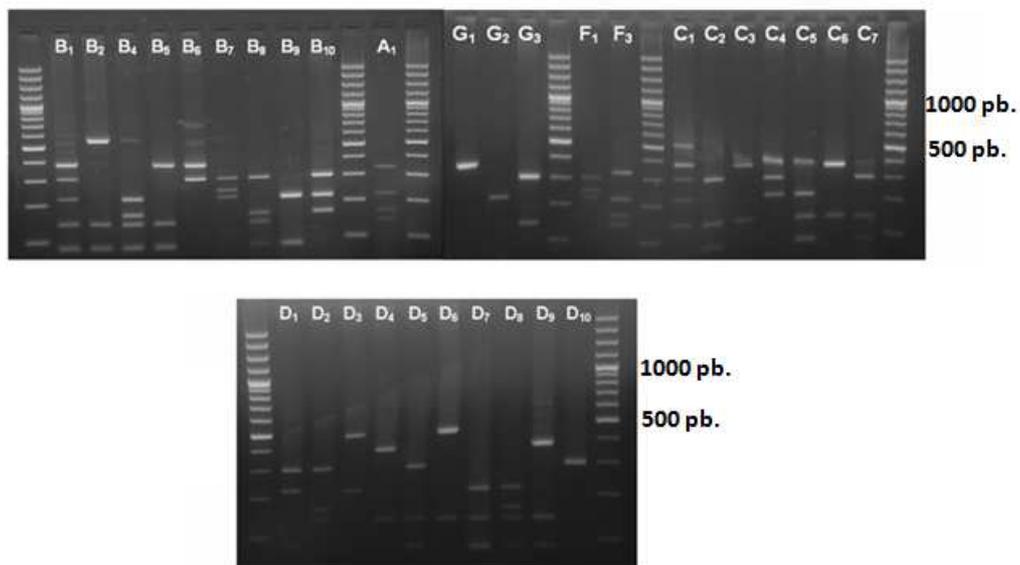


Figura 28: Patrones de electroforesis PCR-RFLP del gen de la coagulasa digerido con *CfoI*.

En la tabla 13 aparece la frecuencia de aparición de cada uno de los patrones de digestión de coagulasa obtenidos en las muestras en los distintos hospitales. Los diferentes patrones se definieron con un sistema alfanumérico

donde C corresponde a la coagulasa, las letras A→G corresponden a los patrones obtenidos tras amplificación y los números a las diferentes combinaciones de fragmentos resultantes de la digestión.

	HGC	HCUV	HUR	HVLA	Total
CA ₁			3	1	4
CB ₁	1	2	12	6	21
CB ₁₀				1	1
CB ₂			8	10	18
CB ₄		1	2	1	4
CB ₅		1	2		3
CB ₆			1		1
CB ₇	2	3	7	3	15
CB ₈		3			3
CB ₉		1			1
CC ₁			1	2	3
CC ₂		5	31	4	40
CC ₃			1	1	2
CC ₄	16	19	18	7	60
CC ₅			6	1	7
CC ₆			6		6
CC ₇		1			1
CD ₁	1		8	3	12
CD ₁₀				3	3
CD ₂	1	1	7		9
CD ₃				2	2
CD ₄	2		2		4
CD ₅			1		1
CD ₆	1	5	7	5	18
CD ₇		1	2		3
CD ₈		2		1	3
CD ₉		2	2		4
CF ₁		1		1	2
CF ₃				1	1
CG ₁			1		1
CG ₂			1		1
CG ₃		1			1
Total	24	49	129	53	255

Tabla 13: Frecuencia de aparición de los patrones de digestión de la coagulasa. Se destacan rodeados los más frecuentes.

Cuando analizamos la frecuencia de aparición de los diferentes patrones de digestión vemos que en las cepas aisladas del HUR el patrón mayoritario fue el C₂ (31 de las 129 cepas), en el HCUV fue el C₄ (19 de las 49 cepas), en el HVLA fue el B₂ (10 de 53 cepas) y en el HGC el mayoritario fue el C₄ (16 de las 24 cepas).

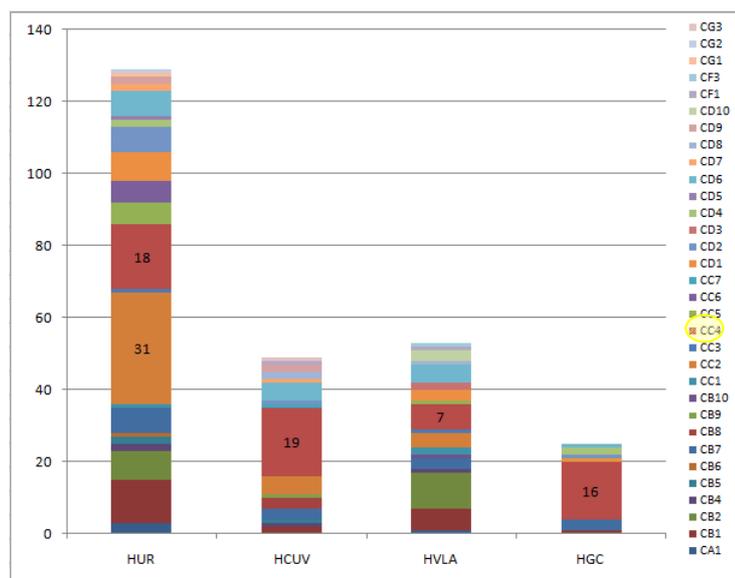


Figura 29: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de digestión de coagulasa para cada uno de los hospitales.

Pese a la gran diversidad de patrones en todos los hospitales (figura 29), todos coincidieron en el genotipo CC₄ (en color rojo) como mayoritario; si bien en el HUR fue mayoritario el genotipo CC₂ (predominante en las cepas procedentes de Medicina Intensiva) y que también se detectó en los demás hospitales aunque con menor representación.

4.4.1.2 Patrones PCR-RFLP obtenidos para la proteína A

La amplificación de la región de ADN comprendida entre los cebadores Spa 1m y Spa 2c permitió la detección de 4 amplicones diferentes (I, II, III y IV) con tamaños comprendidos entre los 1200 y 1500 pb (figura 30).

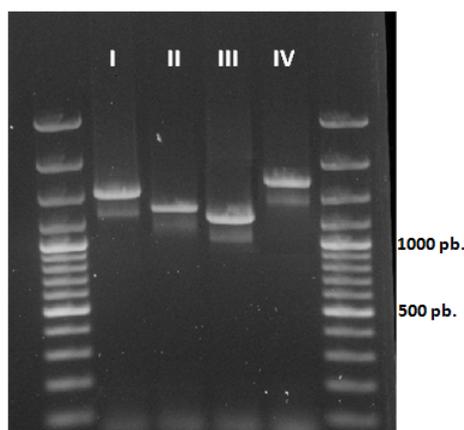


Figura 30: Amplificación por PCR del gen de la proteína A. Los diferentes productos de PCR observados en las cepas de *S. aureus* aparecen las carreras 2-5 (I-IV). Las carreras de los extremos se corresponden con el control de PM.

Al analizar los resultados, los perfiles más frecuentes fueron los patrones IV en un 61% de los casos (156 de 255 cepas), seguido de I (19%). Al contrario de lo que ocurría en el caso de la coagulasa, no hay coincidencia entre hospitales en cuanto al patrón más frecuente. Así, el mayoritario fue el I para el HVLA, el II para el HGC y el IV tanto para el HUR como para el HCUV (figura 31)

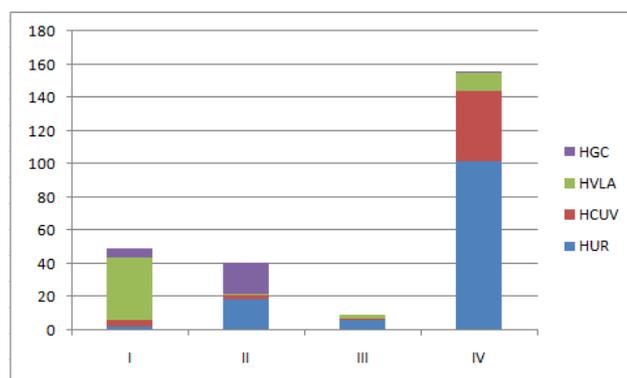


Figura 31: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de proteína A para cada uno de los hospitales.

Cuando el producto de la PCR se digiere con *CfoI* se obtienen fragmentos de entre 200 y 1200 pb. Al separar los fragmentos resultantes por obtenemos 26 patrones de digestión (I₁, I₂, I₃, I₄, I₅, I₆, I₇, II₁, II₃, II₅, II₆, II₇, II₈, II₉, III₂, III₃, III₄, III₅, IV₁, IV₂, IV₃, IV₄, IV₅, IV₆, IV₇, IV₉) que se muestran en la figura 32.

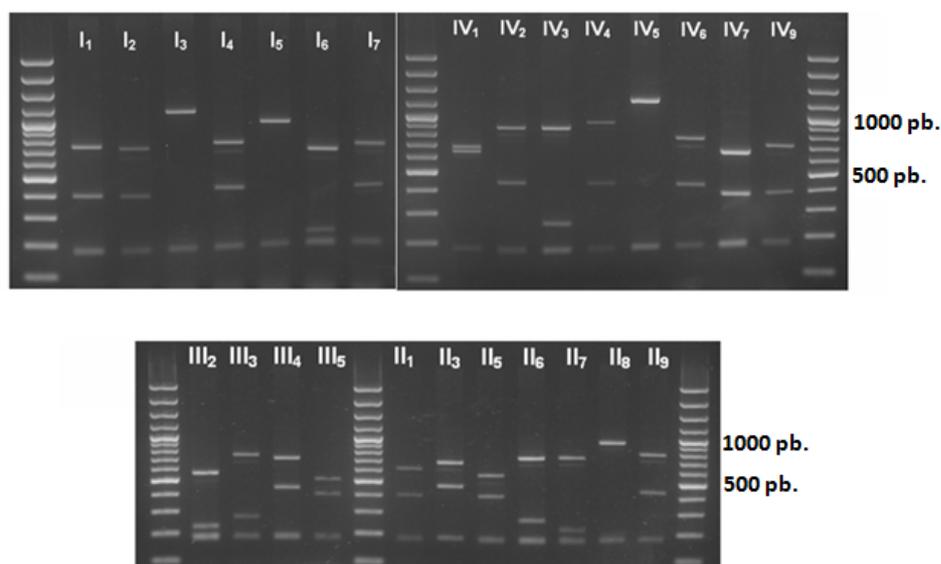


Figura 32: Patrones de electroforesis PCR-RFLP de la proteína A digerido con *CfoI*.

Resultados

La tabla 14 recoge los datos de la frecuencia de aparición de cada uno de los patrones de digestión de proteína A obtenidos, diferenciados por hospitales. Los diferentes patrones se definieron con un sistema alfanumérico donde P corresponde a la proteína A, los números romanos I→IV corresponden a los patrones obtenidos tras amplificación y los números a las diferentes combinaciones de fragmentos resultantes de la digestión.

	HCG	HCUV	HUR	HVLA	Total
PI1				2	2
PI2		1	1		2
PI3		2		1	3
PI4		1		4	5
PI5				1	1
PI6	3			22	25
PI7	2		1	9	12
PII1	16	2	7		25
PII3				1	1
PII5			1		1
PII6	1		2		3
PII7	1		2		3
PII8			2		2
PII9			5		5
PIII2				1	1
PIII3			4	1	5
PIII4			1		1
PIII5		1	1		2
PIV1		29	44	4	77
PIV2			7	2	9
PIV3	1	11	48		60
PIV4			3		3
PIV5		1			1
PIV6		1			1
PIV7				4	4
PIV9				1	1
Total	24	49	129	53	255

Tabla 14: Frecuencia de aparición de los patrones de digestión de la proteína A en las cepas analizadas de los diferentes hospitales.

Cuando analizamos la frecuencia de aparición de los diferentes patrones de digestión vemos que en las cepas aisladas del HUR el patrón mayoritario fue el IV₃ (48 de las 129 cepas), en el HCUV fue el IV₁ (29/49), en el HVLA fue el I₆ (22/ 53) y en el HGC el mayoritario fue el II₁ (16/24) (figura 33).

Resultados

Al analizar los resultados, en las cepas que presentaron Clumping factor B positivo, los perfiles más frecuentes fueron los del patrón β , que está representado en los cuatro hospitales estudiados en un 26% de los casos (68 de 255 cepas), seguido de γ (22%) que aparece en todos excepto en el HGC (figura 35).

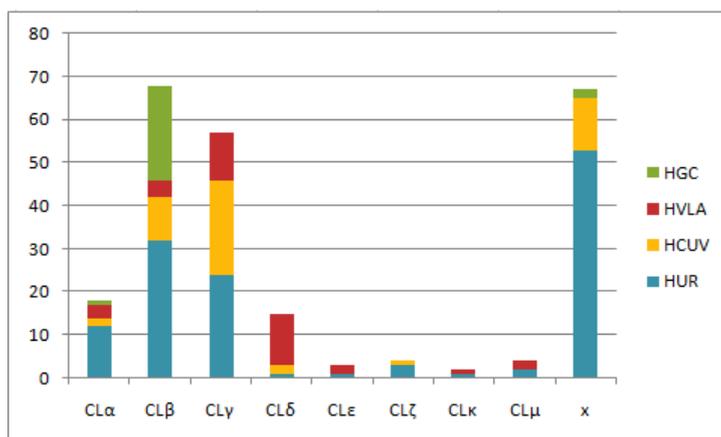


Figura 35: Número de aislados agrupados en función del tipo de patrón de clumping factor B para cada uno de los hospitales.

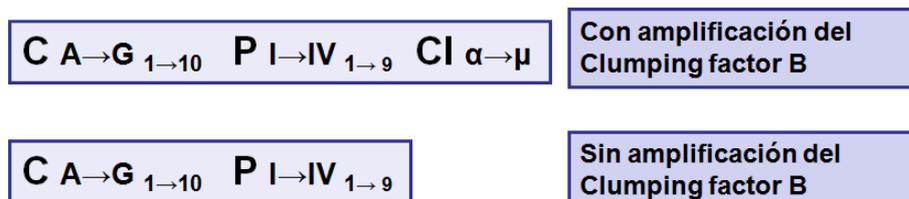
Al estudiar los patrones mayoritarios en cada uno de los hospitales (Tabla 15), podemos observar que en las cepas aisladas en el HUR (32/129) y en el HGC (22/ 24) predominó el patrón β , mientras que en el HCUV fue el γ (22/49) y en el HVLA fue el δ (12/53). Los patrones se nombraron con un sistema de letras romanas y griegas donde Cl corresponde al clumping, y las letras griegas $\alpha \rightarrow \mu$ corresponden a los patrones obtenidos tras la amplificación.

	HGC	HCUV	HUR	HVLA	Total
CL α	1	2	12	3	18
CL β	22	10	32	4	68
CL γ		22	24	11	57
CL δ		2	1	12	15
CL ϵ			1	2	3
CL ζ		1	3		4
CL κ			1	1	2
CL μ			2	2	4
X	1	12	53	18	84
Total	24	49	129	53	255

Tabla 15: Frecuencia de aparición de los patrones del clumping factor B. X: número de cepas en las que no se obtuvo producto de amplificación.

4.4.1.4 Combinación patrones PCR-RFLP obtenidos para la Coagulasa, la Proteína A y el Clumping factor B

Los diferentes genotipos se definieron con el sistema alfanumérico comentado para cada uno de los marcadores:



C corresponde a la coagulasa, las letras A→G y los números a las diferentes combinaciones de fragmentos resultantes. **P** corresponde a la proteína A, los números romanos I→IV y los guarismos a las diferentes combinaciones de fragmentos. Por último, en el caso de que se obtuviera amplificación del gen del clumping, **Cl** corresponde al clumping, y las letras griegas α→μ a los diferentes patrones.

El análisis conjunto de los genes *coa/spa/clfB* diferenció 132 genotipos, lo que demuestra una gran diversidad intraespecífica.

Al analizar estos genotipos observamos que 99 de ellos eran únicos; es decir únicamente aparecían en un aislado: 42 en el caso del HUR (lo que representa un 32,6% de las cepas estudiadas), 14 para el HCUV (28,6%), 36 en el HVLA (68%) y 7 en el HGC (29,2%).

El número de genotipos diferentes para cada uno de los hospitales fue de 64 para el HUR, 28 para el HCUV, 44 para el HVLA y 11 en el caso del HGC. La mayor variabilidad la encontramos en el HVLA en proporción al número de muestras estudiado.

En la tabla 16 se muestran los diferentes genotipos aislados en el HUR en función del origen nosocomial (separados en Servicio de Medicina Intensiva y el resto de servicios), extrahospitalario y asociado a cuidados sanitarios.

Resultados

	Nosocomiales		IACS	Extrahospitalarias	Total
	M. Intensiva	Otros servicios			
CA1PIII3CL α		1			1
CA1PIII3CL μ				1	1
CA1PIV1CL ζ			1		1
CB1PII7CL γ				1	1
CB1PIV1CL β		1	2		3
CB1PIV1CL γ	1	2		2	5
CB1PIV1CL ϵ		1			1
CB1PIV2CL β		1			1
CB1PV2CL γ				1	1
CB2PII9CL β		1			1
CB2PIII5			1		1
CB2PIV1			2		2
CB2PIV1CL α				1	1
CB2PIV1CL β				1	1
CB2PIV1CL ζ		1	1		2
CB4PIV1				1	1
CB4PIV4		1			1
CB5PIV4				2	2
CB6PIV1CL γ				1	1
CB7PIV3	1		2	2	5
CB7PIV3CL α		1			1
CB7PIV3CL γ		1			1
CC1PIV1CL β	1				1
CC2PII8	1				1
CC2PIV2				1	1
CC2PIV3	12	7	4	5	28
CC2PIV3CL γ		2			2
CC3PV1CL k				1	1
CC4PII1CL β				2	2
CC4PII1CL γ			1		1
CC4PII6CL β			1		1
CC4PII6CL γ			1		1
CC4PIII3CL γ			1		1
CC4PIII4CL γ			1		1
CC4PIV1CL β		2	2	1	5
CC4PIV1CL γ			2	3	5
CC4PIV2CL β				1	1
CC5PIV3	3	2			5
CC5PIV3CL α			1		1
CC6PII1	1	1	1		3
CC6PII7CL α		1			1
CC6PIV3		1		1	2
CD1PIV1CL α				2	2
CD1PIV1CL β	2			1	3
CD1PIV1CL γ				1	1
CD1PIV2CL α			1		1
CD2PII9CL β		3			3
CD2PII3CL γ				1	1
CD2PIV1CL β		1			1
CD2PIV2CL β			1		1
CD2PIV3		1			1
CD4PII9CL δ		1			1
CD4PIV2CL γ		1			1
CD5PIV3CL γ		1			1
CD6PII5CL α				1	1
CD6PIV1CL α		1			1
CD6PIV1CL β		1	1	2	4
CD6PIV1CL μ				1	1
CD7PIV2CL β			1		1
CD7PIV3			1		1
CD9PII1CL α				1	1
CD9PIV1CL β		1			1
CG1PIV3CL β		1			1
CG2PII8CL α				1	1
Total general	22	39	29	39	129

Tabla 16: Genotipos del HUR en función de su origen, en amarillo el más frecuente.

De acuerdo con los datos recogidos en la tabla 16, el patrón más frecuente en el HUR es el que denominamos CC₂PIV₃, tanto intrahospitalario como comunitario. Fue además el más frecuente entre los aislados de Medicina Intensiva recogidos durante el periodo (julio del 2007 a febrero del 2008), lo que nos permitió confirmar que nos encontrábamos frente a un brote clonal. También es interesante resaltar que todos los aislados nosocomiales que presentaron este genotipo eran SARM, sin embargo los de procedencia comunitaria y las IACS eran SASM.

Para el HCUV el genotipo mayoritario fue el CC₄PIV₁Cl γ con un 28,6% de las cepas, en el HVLA el CB₂PI₆ con un 11,5% de las cepas y en el HGC CC₄PII₁Cl β con un 45,8% de las cepas.

No hubo coincidencia de un mismo genotipo en todos los hospitales (figura 36). Únicamente coincidió el CC₄PIV₁CL γ en tres de ellos: 5 cepas de este genotipo en el HUR (4 SARM y 1 SASM), 14 cepas en el HCUV (13 SARM y 1 SASM) y 2 en el HVLA (ambas SASM).

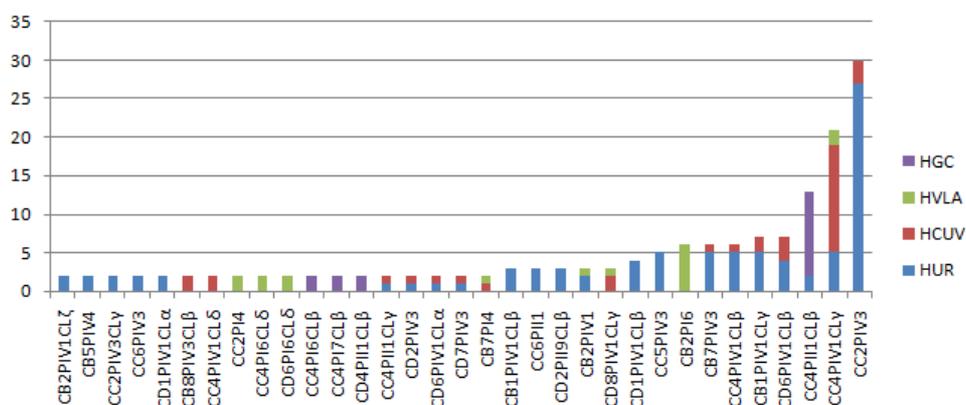


Figura 36: Genotipos con más de una cepa encontrados en los diferentes hospitales.

El estudio comparativo del grado de homología entre los distintos perfiles, se realizó utilizando el coeficiente de Dice. Este análisis proporcionó, 46 perfiles distintos que se identificaron numéricamente y con homologías intra e inter-poblacionales del 11 al 100%. En aquellos perfiles en los que la similitud de los aislados incluidos en cada uno de ellos fluctuaba entre el 70% y el

Resultados

100%, se establecieron subgrupos de homología conformados por aislados denominados como el patrón de origen seguido por una letra mayúscula. En la tabla 17 se muestran los grupos, subgrupos y los genotipos de PCR-RFLP incluidos en cada uno de ellos, así como el número de aislados representados.

Grupo	Subgrupo	PCR-RFLP	Nº Cepas
RFLP 1	1A	CC1PI7CLy	1
	1B	CB7PII1	1
	1C	CD2PII1CLβ	1
	1D	CC6PII1	3
RFLP 2	2	CB7PIV7	1
RFLP 3	3A	CC5PI6CLδ	1
	3B	CC2PI6CLδ	1
RFLP 4	4A	CD2PII9CLβ	3
	4B	CD2PIV2CLβ	1
	4C	CD7PIV2CLβ	1
	4D	CC2PIV2	1
RFLP 5	5A	CD2PIV1CLβ	1
	5B	CG3PIV1CLβ	1
RFLP 6	6	CC6PII7CLα	1
RFLP 7	7A	CB2PI6	6
	7B	CB2PI6CLδ	1
	7C	CD4PII1CLβ	2
RFLP 8	8A	CB2PIV1	3
	8B	CB2PIV1CLα	1
	8C	CB2PIV1CLβ	1
	8D	CB2PIV1CLζ	2
RFLP 9	9	CB2PI7	1
RFLP 10	10A	CB2PII9CLβ	1
	10B	CB2PIV2	1
	10C	CD4PII9CLδ	1
	10D	CC3PI7CLκ	1
	10E	CD4PIV2CLy	1
	10F	CD3PI7CLμ	1
RFLP 11	11	CC3PI2CLκ	1
RFLP 12	12	CD3PII2CLε	1
RFLP 13	13A	CB5PIV4	2
	13B	CD10PII3CLβ	1
RFLP 14	14	CD10I3CLα	1
RFLP 15	15	CF3PI5	1
RFLP 16	16A	CB8PIV3CLβ	2
	16B	CB8PIV3CLα	1
RFLP 17	17A	CA1PII3CLα	1
	17B	CF1PII3CLα	1
	17C	CA1PIV9CLα	1
	17D	CA1PII3CLμ	1
RFLP 18	18A	CB1PI4	1
RFLP 19	19A	CB4PIV4	1
	19B	CB4PIV7	1
	19C	CD6PI3CLβ	1
	19D	CD9PI3CLβ	1
RFLP 20	20A	CD6PI6CLy	1
	20B	CD6PII1CLα	1
	20C	CD6PI6CLδ	2
	20D	CB4PII1	1
	20E	CD6PI6CLε	1
RFLP 21	21	CD9PII1CLα	1
RFLP 22	22	CD6PII5CLα	1
RFLP 23	23A	CA1PIV1CLζ	1
	23B	CF1PIV1CLζ	1
	23C	CB4PIV1	1
	23D	CD9PIV1	1
	23E	CB1PIV1CLε	1
RFLP 24	24A	CD6PIV1CLα	2
	24B	CD6PIV1CLμ	1
	24C	CD6PIV1CLβ	7
	24E	CC1PI7CLβ	1
	24F	CC1PIV1CLβ	1
	24G	CD9PIV1CLβ	1
RFLP 25	25	CD6PI7CLβ	1
RFLP 26	26	CG1PIV3CLβ	1
RFLP 27	27A	CC4PII6CLβ	1
	27B	CC4PII6CLy	1
RFLP 28	28	CD1CLβ	1
RFLP 29	29A	CD1PIV1CLα	2
	29B	CD1PIV2CLα	1
RFLP 30	30A	CC4PI6CLδ	2
	30B	CB1PI6CLδ	1
	30C	CD1PI6CLδ	1
	30D	CC4PIV1CLδ	2
	30E	CC4PIV2CLδ	1
	30F	CC4PI6CLβ	2
	30G	CC4PII1CLβ	13
	30H	CB1PI6CLβ	1
	30I	CD1PI6CLβ	1
	30J	CC4PI6CLμ	1
RFLP 31	31A	CC4PI7CLβ	2
	31B	CC4PIV1CLβ	6
	31C	CB1PIV1CLβ	3
	31D	CD1PIV1CLβ	4
	31E	CB1PIV2CLβ	1
	31F	CC4PIV2CLβ	1
	31G	CC4PII7CLβ	1
RFLP 32	32A	CD1PI7CLy	1
	32B	CC1PI7CLy	1
RFLP 33	33A	CC4PIV1CLy	21
	33B	CD10PI7CLy	1
	33C	CB1PIV1CLy	7
	33D	CD1PIV1CLy	1
	33E	CB6PIV1CLy	1
	33F	CB5PIV1CLy	1
	33G	CD8PIV1CLy	3
	33H	CC4PII1CLy	2
	33I	CC4PI6CLy	1
	33J	CB1PI6CLy	1
RFLP 34	34A	CC4PII3CLy	1
	34B	CC4PII3CLy	1
	34C	CC4PI2CLy	1
RFLP 35	35A	CB1PIV7CLδ	1
	35B	CB1PIV7CLy	1
RFLP 36	36A	CB1PI7CLy	1
	36B	CB1PI7CLy	1
	36C	CB1PII7CLy	1
RFLP 37	37	CB2PII5	1
RFLP 38	38	CG2PII8CLα	1
RFLP 39	39A	CC2PII8	1
	39B	CC2PII5	1
RFLP 40	40A	CD5PIV3CLy	1
	40B	CC7PIV3CLy	1
RFLP 41	41A	CC2PIV3CLy	2
	41B	CB7PIV3CLy	1
	41C	CC2PIV3CLβ	1
	41D	CB7PIV3CLβ	1
	41E	CD7PIV3	2
	41F	CC2PIV3	30
	41G	CD2PIV3	2
	41H	CB7PIV3	6
	41I	CB7PIV3CLα	1
RFLP 42	42A	CC5PIV3	5
	42B	CC5PIV3CLα	1
	42C	CC6PIV3	2
RFLP 43	43A	CC2PI4	2
	43B	CB7PI4	2
RFLP 44	44	CB7PIV5	1
RFLP 45	45A	CD2PII3CLy	1
	45B	CC2PI1	1
	45C	CB7PIV3CLy	1
RFLP 46	46	CB9PIV6	1

Tabla 17: Grupos y subgrupos de homología de PCR-RFLP tras aplicar el coeficiente de Dice.

Resultados

En el dendograma (figura 37) perteneciente a las muestras de Medicina Intensiva vemos como el 72,73% de los aislados están estrechamente relacionados de acuerdo con los criterios de Tenover y que 12 de las 22 cepas analizadas eran idénticas.

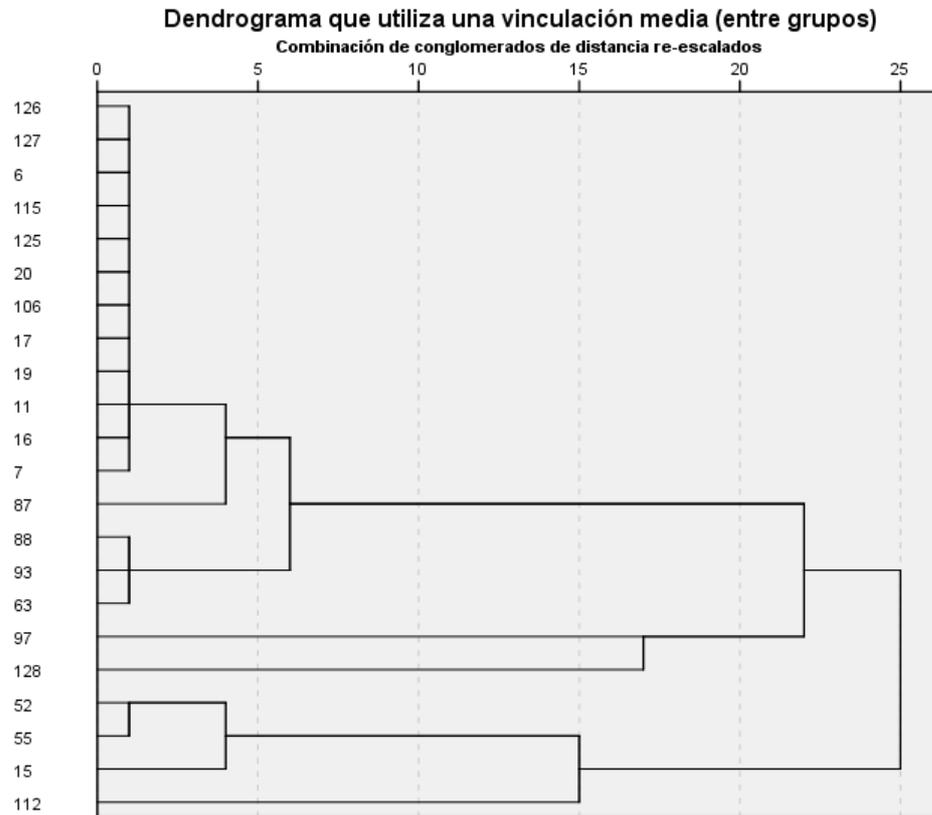


Figura 37: Dendograma de homología de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva.

En la matriz de distancias (figura 38) vemos las relaciones entre todas ellas con el siguiente código de colores:

- Cepas idénticas: 1,000.
- Cepas estrechamente relacionadas: $> 0,700 - < 1,000$.
- Cepas posiblemente relacionadas: $0,500 - 0,700$.
- Cepas no relacionadas: $< 0,500$.

Resultados

PATRÓN	Nº BANDAS	TAMAÑO	AISLADOS	Nº
R1	10	710, 670, 300, 260, 200, 100, 90, 70, 40, 30	2, 4, 6, 7, 10, 11, 15, 16, 19, 20, 37, 42, 51, 63, 87, 88, 93, 95, 96, 97, 103, 106, 108, 109, 110, 115, 125, 126, 127, 128, a17	31
R2	8	710, 670, 300, 280, 200, 190, 40, 30	75	1
R3	11	800, 480, 300, 230, 160, 100, 90, 70, 60, 40, 30	31, 41	2
R4	8	560, 480, 300, 200, 160, 100, 60, 40	91	1
R5	12	710, 670, 400, 350, 280, 260, 150, 120, 100, 70, 40, 30	5, 22, 23, 24, 26, 28, 61, 65, 66, 79, 81, 83, 90, 118, 122, 131	16
R6	9	560, 470, 300, 280, 150, 130, 120, 100, 30	33, 32, 54, 78	4
R7	9	560, 400, 300, 280, 230, 190, 130, 100, 30	21, 34, 69, 70, 73, 80, 85, 86, 105, 111, c4, c9, c11, c20, c22, c23, c24, c26, c30, c31, c32, c35, c37	23
R8	9	560, 350, 190, 160, 150, 100, 70, 60, 40	17, 52, 55	3
R9	8	560, 470, 350, 160, 130, 100, 40, 30	112, 114, 132	3
R10	14	800, 670, 580, 470, 450, 420, 400, 350, 280, 100, 70, 60, 40, 30	8	1
R11	12	470, 450, 400, 260, 230, 160, 150, 130, 120, 100, 70, 60	40, 121	2
R12	11	470, 450, 400, 280, 260, 160, 120, 100, 60, 40, 30	46, 48, Cs2, Cs6, Cs8, Cs16, Cs17, Cs25	8
R13	10	480, 430, 400, 350, 300, 230, 190, 150, 90, 40	9, 30, 56, 82, 92, 104, 107, 117, a2, a3, a8, a21, a24	13
R14	12	480, 430, 420, 400, 350, 300, 260, 230, 190, 150, 90, 30	3, 27, 38, 43, 44, 47, 49, 57, 59, 67, 71, 72, 77, 89, 113, 116, 119, 123, 124	19
R15	10	560, 430, 420, 400, 350, 230, 190, 150, 90, 30	99	1
R16	8	480, 430, 400, 350, 280, 230, 190, 150	29, 94, 98	3
R17	6	480, 400, 350, 200, 190, 90	25	1
R18	11	480, 470, 420, 400, 380, 300, 260, 200, 190, 120, 70,	12, 36, 84	3
R19	6	470, 400, 350, 300, 260, 120	60	1
R20	7	430, 400, 350, 300, 280, 200, 120	50, 68, 76	3
R21	7	470, 420, 350, 300, 280, 200, 90	18	1
R22	7	450, 400, 350, 300, 200, 100, 70	1	1
R23	10	480, 430, 400, 350, 300, 280, 260, 230, 150, 60	101, 102, a5, a27, a28, a41, a42, a6, a20, a33, a35, a43, a44, a49, a36, a45	16
R24	6	430, 400, 350, 300, 230, 190	45, 64, 120, c2, c18, a32, a52	7
R25	7	430, 400, 350, 300, 280, 200, 130	35	1
R26	6	480, 430, 350, 300, 280, 120	130, a10, a47	3
R27	12	710, 560, 480, 450, 300, 260, 200, 120, 100, 60, 40, 30	14, c49	2
R28	10	800, 480, 450, 260, 230, 200, 190, 160, 100, 90	39, 53, c10, c21, c27, c28, Cs15	7
R29	7	670, 280, 260, 230, 190, 90, 30	74	1
R30	7	430, 350, 280, 200, 150, 120, 90	58	1
R31	10	560, 470, 430, 300, 260, 130, 100, 60, 40, 30	62, c33, c41, c42, c45, c25, c39, c42, c43, Cs1, Cs3, Cs4, Cs5, Cs10, Cs11, Cs18, Cs19, Cs20, Cs21, Cs22, Cs23, Cs24, Cs26	23
C32	10	430, 400, 300, 230, 160, 100, 70, 60, 40, 30	c16, c46	2
C33	10	560, 430, 420, 400, 380, 300, 280, 260, 120, 70	c7	1
C34	7	460, 400, 280, 100, 90, 60, 30	c15, c34, Cs7, Cs9, Cs13	5
C35	9	470, 420, 400, 380, 300, 280, 260, 160, 60	c12	1
C36	9	450, 400, 380, 350, 300, 280, 260, 120, 60	c50, a29, a30, a31, a34, a37, a38, a40, a46, a48, a50, a51	12
C37	5	430, 300, 150, 70, 60	c45	1
C38	7	430, 300, 230, 100, 70, 40, 30	c17, c48, c19, a16	4
C39	6	430, 400, 380, 350, 200, 90	c1	1
C40	6	420, 400, 380, 350, 130, 40	c5	1
C41	5	450, 230, 150, 100, 60	c14	1
C42	9	450, 420, 350, 260, 130, 100, 70, 60, 30	c36	1
C43	9	430, 420, 380, 230, 160, 120, 60, 40, 30	c3	1
C44	8	450, 420, 300, 230, 160, 70, 60, 30	c29, c38	2
C45	5	430, 350, 100, 70, 40	c13	1
C46	7	560, 380, 350, 300, 200, 130, 40	c6, c8	2
A47	7	430, 350, 300, 280, 230, 200, 70	a9, a14	2
A48	8	470, 400, 350, 260, 190, 160, 120, 70	a1, a53	2
A49	7	480, 430, 400, 350, 260, 200, 60	a7, a19, a23	3
A50	6	560, 430, 400, 260, 230, 100	a15, a25	2
A51	8	470, 430, 400, 350, 230, 200, 190, 90	a4, a13, a18, a39	4
A52	6	480, 430, 350, 260, 230, 90	a22	1
A53	9	470, 430, 400, 350, 280, 260, 200, 160, 40	a11	1
A54	8	470, 350, 260, 200, 160, 120, 60, 30	a12	1
A55	8	670, 600, 350, 300, 160, 120, 100, 40	a26	1

Tabla 18: Perfiles de PFGE del total de cepas tipadas. Número y tamaño de los fragmentos encontrados. Número de cepas incluidas en cada uno de los patrones.

Estos 55 patrones de PFGE distintos se identificaron numéricamente y con homologías intra e inter-poblacionales del 11 al 100%. En la figura 39 se muestra la matriz de contingencia de aquellos patrones no únicos, es decir, que incluían más de un aislado; mediante un código de colores que corresponde:

-  Cepas idénticas: 1,000.
-  Cepas posiblemente relacionadas: 0,500 – 0,700.
-  Cepas no relacionadas: < 0,500.

El grado de homología entre los patrones en los que se incluyó más de un aislado se resume en el dendograma de la figura 40.

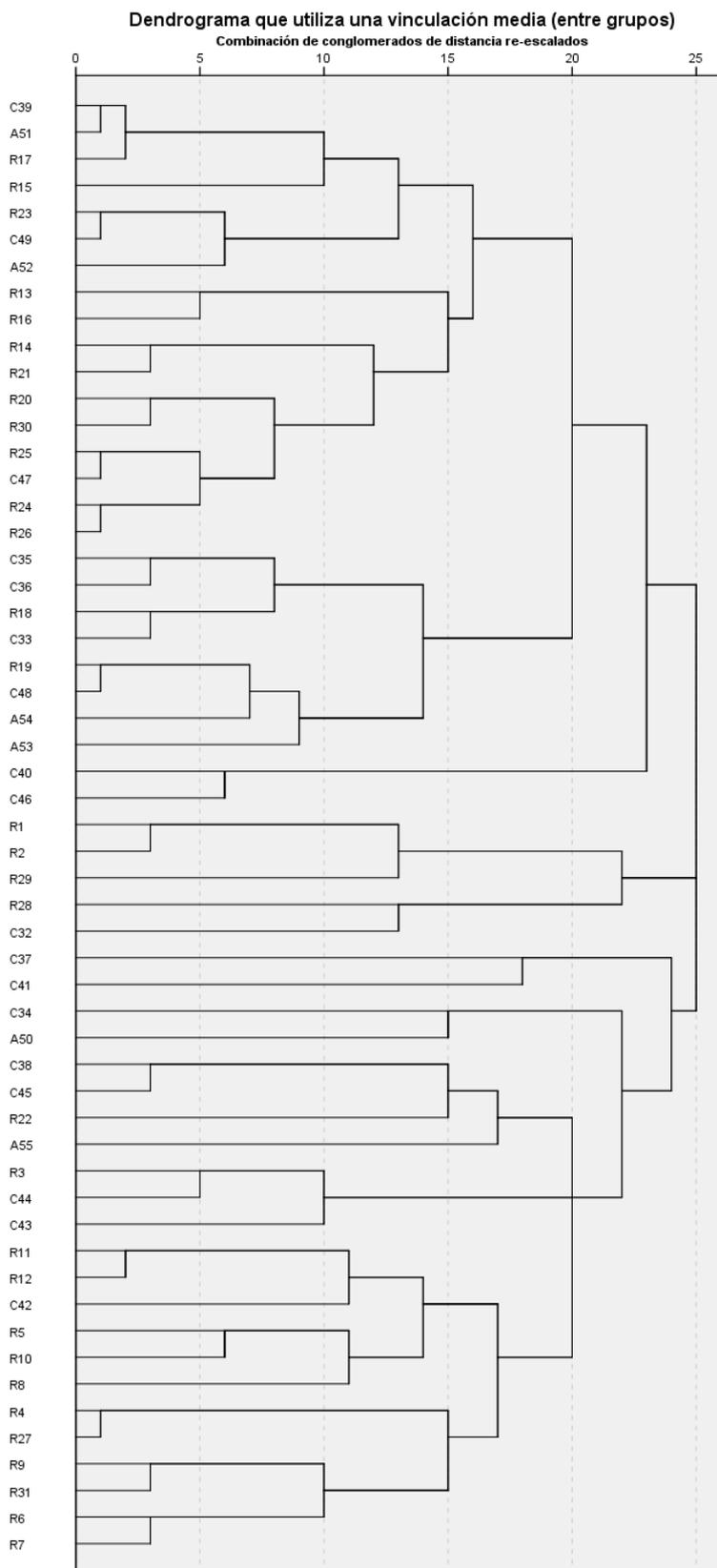


Figura 40: Dendrograma de los patrones no únicos obtenidos con la enzima de restricción *SmaI* tras análisis PFGE de las muestras procedentes de los cuatro hospitales (HUR, HGC, HVLA, HCUV).

Resultados

En el caso de los patrones R1, R3, R5, R6, R7, R8, R9, R11, R12, R13, R14, R16, R18, R20, R23, R24, R26, R27, R28, R31, C32, C34, C36, C38, C44, C46, C47; C48, C49, A50 y A51 en los que la similitud de los aislados incluidos en cada uno de ellos fluctuaba entre el 70% y el 100%, se establecieron subgrupos de homología conformados por aislados con similitud del 100%, que fueron denominados como el patrón de origen seguido por una letra minúscula. Como ejemplo se muestran las relaciones intra-grupo de los patrones R1 y R7 en la figura 41.

7a	1,000						
7b	0,947	1,000					
7c	0,889	0,842	1,000				
7d	0,824	0,778	0,824	1,000			
7e	0,710	0,767	0,710	0,842	1,000		
7f	0,778	0,737	0,778	0,824	0,800	1,000	
7g	0,717	0,731	0,767	0,706	0,800	0,889	1,000
	7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g

1a	1,000							
1b	0,947	1,000						
1c	0,952	0,900	1,000					
1d	0,909	0,857	0,957	1,000				
1e	0,900	0,947	0,857	0,818	1,000			
1f	0,857	0,900	0,818	0,783	0,952	1,000		
1g	0,842	0,889	0,800	0,762	0,842	0,800	1,000	
1h	0,857	0,800	0,818	0,783	0,762	0,818	0,800	1,000
	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h

Figura 41: Grado de similitud intra-subgrupo de homología.

Así, en el caso del patrón R1 se identificaron ocho subgrupos de homología (R1a a R1h), dos en R3 (R3a a R3b), cinco en R5 (R5a a R5e), dos en R6 (R6a a R6b), siete en R7 (R7a a R7g), tres en R8 (R8a a R8c), tres en R9 (R9a a R9c), dos en R11 (R11a a R11b), cuatro en R12 (R12a a R12d), diez en R13 (R13a a R13j), trece en R14 (R14a a R14m), tres en R16 (R16a a R16c), dos en R18 (R18a a R18b), tres en R20 (R20a a R20c), siete en R23 (R23a a R23g), siete en R24 (R24a a R24g), tres en R26 (R26a a R26c), dos en R27 (R27a a R27b), siete en R28 (R28a a R28g) y quince en R31 (31a a 31p); en el caso del patrón C32 se identificaron dos subgrupos de homología (C32a a C32b), cinco en C34 (C34a a C34e), doce en C36 (C36a a C36l), cuatro en C38 (C38a a C38d), dos en C44 (C44a a C44b) y dos en C46 (C46a a C46b) y en el caso del patrón A47 se identificaron dos subgrupos de homología (A47a a A47b), dos en A48 (A48a a A48b), tres en A49 (A49a a A49c), dos en A50 (A50a a A50b) y cuatro en A51 (A51a a A51d). El número de aislados correspondientes a cada subtipo se muestran en la tabla 19.

PATRÓN	SUBTIPO	Nº AISLADOS	PATRÓN	SUBTIPO	Nº AISLADOS	
R1	1a	18	R24	24a	1	
	1b	1		24b	1	
	1c	6		24c	1	
	1d	1		24d	1	
	1e	2		24e	1	
	1f	1		24f	1	
	1g	1		24g	1	
	1h	1		R26	26a	1
	R3	3a	1		26b	1
3b		1	26c		1	
R5	5a	4	R27	27a	1	
	5b	1		27b	1	
	5c	6	R28	28a	1	
	5d	2		28b	1	
5e	3	28c		1		
R6	6a	2		28d	1	
	6b	2		28e	1	
R7	7a	1		28f	1	
	7b	1		28g	1	
	7c	1		R31	31a	1
	7d	5	31b		1	
	7e	1	31c		1	
	7f	1	31d		1	
	7g	13	31e		1	
R8	8a	1	31f		2	
	8b	1	31g		2	
	8c	1	31h		4	
R9	9a	1	31i		2	
	9b	1	31j		1	
	9c	1	31k		2	
R11	11a	1	31l		1	
	11b	1	31m		2	
R12	12a	2	31n		1	
	12b	2	31p	1		
	12c	3	C32	32a	1	
	12d	1		32b	1	
R13	13a	1	C34	34a	1	
	13b	1		34b	1	
	13c	4		34c	1	
	13d	1		34d	1	
	13e	1		34e	1	
	13f	1	C36	36a	1	
	13g	1		36b	1	
	13h	1		36c	1	
	13i	1		36d	1	
	13j	1		36e	1	
	R14	14a		4	36f	1
		14b		2	36g	1
		14c		1	36h	1
14d		2		36i	1	
14e		3		36j	1	
14f		1		36k	1	
14g		2		36l	1	
14h		1	C38	38a	1	
14i		1		38b	1	
14j		1		38c	1	
14k		1		38d	1	
14l	1	C44	44a	1		
14m	1		44b	1		
R16	16a	1	C46	46a	1	
	16b	1		46b	1	
	16c	1	A47	47a	1	
R18	18a	2		47b	1	
	18b	1	A48	48a	1	
R20	20a	1		48b	1	
	20b	1	A49	49a	1	
	20c	1		49b	1	
20c	1	49c		1		
R23	23a	1	A50	50a	1	
	23b	1		50b	1	
	23c	6	A51	51a	1	
	23d	2		51b	1	
	23e	2		51c	1	
	23f	2		51d	1	
23g	2					

Tabla 19: Número de aislados incluidos en cada subtipo.

Resultados

La mayoría de los aislados procedentes del servicio de Medicina Intensiva (82,6%) se agruparon dentro de un mismo patrón: R1; con un nivel de homología ligeramente superior al detectado para este grupo con el genotipado por PCR-RFLP (72,73%). El dendograma de homología correspondiente a las muestras de este servicio y el resultado en imagen del PFGE se muestran en las figuras 42 y 43, respectivamente.

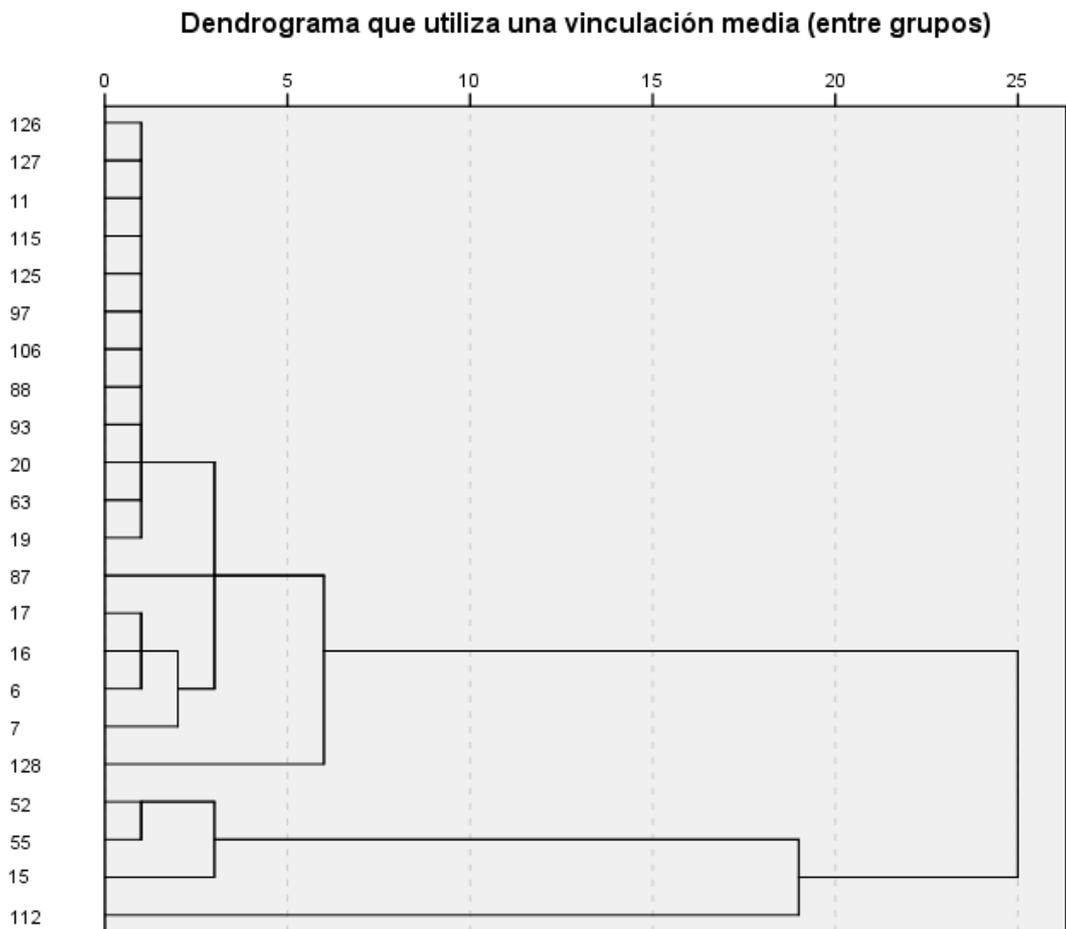


Figura 42: Dendrograma de homología de las muestras del HUR aisladas en el servicio de Medicina Intensiva tras análisis PFGE.

En cuanto al resto de los hospitales, el patrón que incluye un mayor número de aislados en HCUV es el R7 con 13 cepas, seguido del R28, el C32 y el C47 con 4 aislamientos. En el caso del HVLA es el C36 con 11 cepas, seguido del A59 con 7 aislamientos. Y para el HGC el C47 con 14 cepas, seguido del R12 con 6 aislamientos. Como ejemplo podemos ver el gel obtenido de un grupo de aislados del HCUV y del HGC (figura 45).

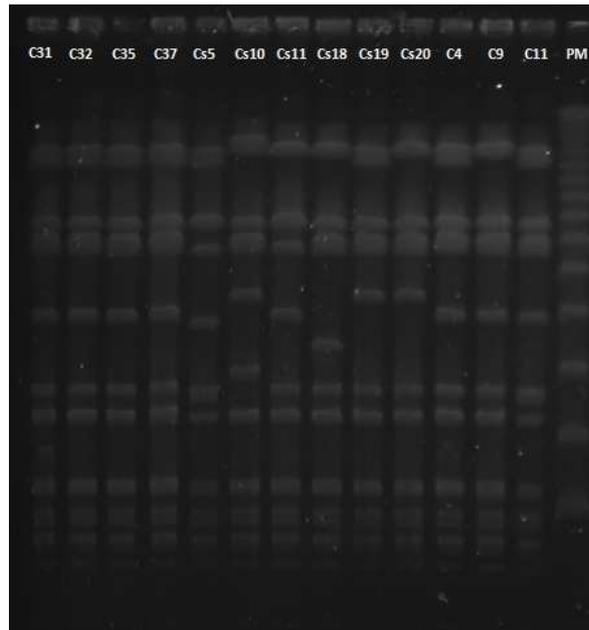


Figura 45: Ejemplo de PFGE de un grupo de muestras del HCUV en las que se observa identidad entre los aislados correspondientes a las cepas C31,32,35,37,4,9,11 y del HGC incluidas entre éstas, en las que se observa una gran heterogeneidad (Cs5,10,11,18,19,20).

4.4.3 Evaluación del poder de discriminación del PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) como método de tipado frente al PFGE

El poder discriminatorio de la técnica PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*), una vez calculado el índice de Simpson fue:

PCR-RFLP (<i>coa-spa-clfB</i>)	D = 0,979
----------------------------------	-----------

Cuando calculamos este mismo índice para los genes *coa* y *spa* de forma independiente, en ambos casos el valor fue inferior al 0,950

recomendado como mínimo deseable. El índice para el análisis del gen del Clumping factor B no se calculó separadamente debido a que no se obtuvo amplificado en todos los aislados.

PCR-RFLP Coagulasa	D = 0,896
PCR-RFLP Proteína A	D = 0,832

Con la combinación de PCR-RFLP (*coa-spa*) obtuvimos un valor ligeramente inferior al obtenido para el análisis conjunto con los tres genes.

PCR-RFLP (<i>coa-spa</i>)	D = 0,968
-----------------------------	-----------

El poder discriminatorio para el PFGE fue el más elevado, como corresponde a la técnica de referencia.

PFGE	D = 0,989
------	-----------

4.4.4 Utilidad del genotipado por PCR-RFLP en la detección de un brote de SARM en el Servicio de Medicina Intensiva

Una vez estudiados los aislados mediante los dos tipos genotipado calculamos con el paquete estadístico SPSS 19 la concordancia entre ambos métodos mediante el índice kappa que nos dio un valor de 0,887 con un error típico de 0,109. Este valor indica un grado de acuerdo muy bueno entre ambos métodos.

En la figura 46 vemos representados los dos dendogramas obtenidos con cada uno de los métodos de tipado en los que se observa una gran homología.

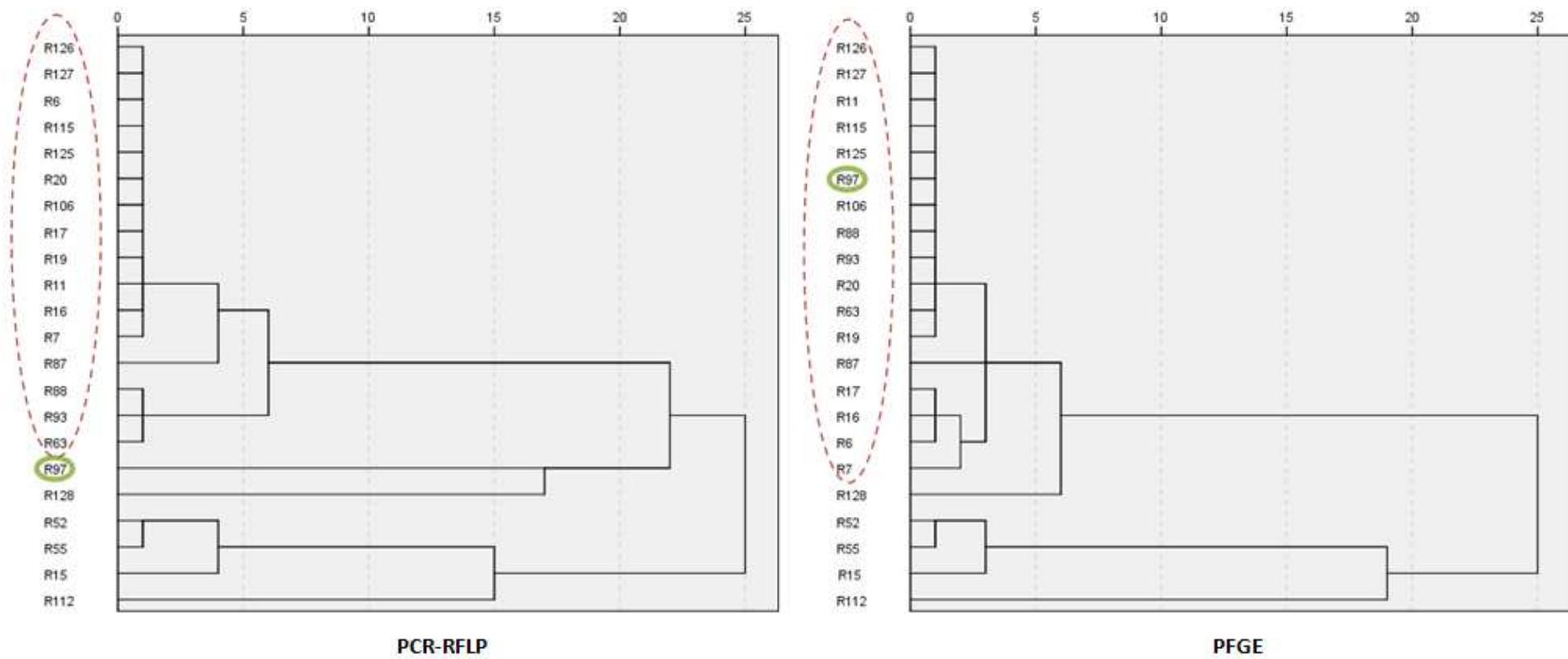


Figura 46: Dendogramas obtenidos para las muestras de Medicina Intensiva estudiadas por los dos métodos de tipado evaluados

5. Discusión

5.1 Sobre la prevalencia de *S. aureus* resistente a meticilina

S. aureus resistente a meticilina (SARM) es una causa frecuente de infección nosocomial, que ha aumentado su presencia en áreas relacionadas con la asistencia sanitaria extrahospitalaria y el ámbito comunitario; convirtiéndose en un problema importante, tanto por la pérdida de alternativas terapéuticas como por sus implicaciones epidemiológicas.

Durante el año 2007 las tasas de SARM en el Departamento de Salud 11 alcanzaron valores alarmantes, en torno al 40%. Este porcentaje prácticamente duplicaba los registrados en años anteriores que se encontraban cercanos al 23%. La mayor parte de las cepas de SARM (66%) eran de adquisición nosocomial y el 51% de éstas procedían del servicio de Medicina Intensiva, por ello nos planteamos que este incremento podría justificarse por la aparición de un brote en dicho servicio. Cuando se produce un brote o epidemia por un patógeno frecuente, como en este caso, se requiere un alto grado de sospecha, así como el conocimiento de su situación pre-epidémica y el patrón habitual de presentación, para poder determinar posibles señales de alarma. En estos casos, los estudios moleculares proveen de información definitiva para establecer si se ha producido diseminación cruzada. En nuestro estudio las técnicas de genotipado confirmaron que se trataba de un brote.

Si en nuestros datos de prevalencia de SARM para ese periodo excluyésemos los casos registrados en la UCI, el porcentaje se reduciría hasta un 29,46%, valor similar al presentado por Cuevas en un estudio multicéntrico realizado en 145 hospitales españoles, en el que se refiere un 31,2% (Cuevas *et al.*, 2008). El estudio EARSS, en el que se recogen únicamente datos de SARM de aislamientos invasivos, reflejaba durante el año 2007 porcentajes de resistencia del 25%. En España parece que los datos de resistencia a meticilina se han estabilizado y tienden a disminuir (Vindel *et al.*, 2009), gracias a las alertas y a la promoción de medidas de prevención y control implantadas en las instituciones sanitarias durante los últimos años. Esta tendencia a la estabilidad

también se refleja en el último informe proporcionado por el EARSS del año 2010, con una tasa de SARM invasivos del 25%.

Para clasificar los aislamientos como resistentes o no a la meticilina, se utilizan los parámetros establecidos por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* 2010) que definen como SARM a aquellos aislados que presentan una CMI ≥ 4 mg/L, o bien los portadores del gen *mecA* con independencia de su antibiotipo. La detección del gen *mecA* por PCR fue positiva en todas las cepas consideradas SARM por antibiotipo, descartando que la resistencia a meticilina pudiera deberse a otros procesos como la hiperproducción de β -lactamasa (cepas BORSA: *boderline S. aureus*) (Croes *et al.*, 2010), la modificación de las PBPs habituales (cepas MODSA: (*modified S. aureus*) (Tomasz *et al.*, 1989) o a la existencia de cepas productoras de una enzima con actividad meticilinasas (Massidda *et al.*, 1996). Cuando se analizaron los aislamientos de SASM encontramos un 2,6% (2/76) portadores del gen *mecA*. Tal como indica Hososaka y colaboradores el tratamiento de estos aislados denominados OS-SARM con β -lactámicos, podría inducir la aparición de cepas SARM de elevada resistencia, especialmente entre aislados comunitarios (Hososaka *et al.*, 2007). Es necesario contemplar la existencia de estas cepas cuando se produzcan fracasos terapéuticos frente a aislados aparentemente sensibles a meticilina y tratados con β -lactámicos, ya que los errores de detección de SARM en el laboratorio podrían tener graves consecuencias clínicas: falsos positivos conducen al uso innecesario de fármacos de segunda línea aumentando la resistencia a estos fármacos, los costes del tratamiento y la toma de medidas de control innecesarias; pero falsos negativos podrían conllevar fracasos terapéuticos y aumentar la propagación de SARM.

Es necesario recordar que los métodos de detección fenotípicos, especialmente los automatizados, presentan limitaciones. En nuestro estudio la concordancia entre los antibiotipos y la detección del *mecA* situó el porcentaje de discordancia en un 0,7% (2/255), por lo que consideramos que el antibiograma ofrecido por los métodos semiautomatizados utilizados (Vitek2 de

BioMèrieux y Walkway de Siemens), permitieron disponer de datos de resistencia a meticilina con la suficiente fiabilidad para la práctica clínica diaria.

5.2 A propósito de la producción de Leucocidina de Panton Valentine

Cuando estudiamos la presencia del gen productor de LPV detectamos 2 cepas positivas entre los 108 aislamientos comunitarios analizados. En trabajos publicados en nuestro país encontramos datos semejantes, como el de Marimón que refiere un 2% (Marimon *et al.*, 2012) , Manzur un 1,5% (Manzur *et al.*, 2008) o el grupo de Blanco con el 3% (Blanco *et al.*, 2011); sin embargo Vindel encuentra tan sólo un 0,7%; probablemente por el sesgo del estudio ya que seleccionaron los aislamientos de un día (Vindel *et al.*, 2009). Con respecto a otros países europeos los datos son similares, Rossney cifra en Irlanda en un 1,8% las cepas de SARM portadoras de LPV (Rossney *et al.*, 2007); y en Alemania, Witte, con 6345 aislados, encuentra una prevalencia del 0,44% (Witte *et al.*, 2005). En Holanda, Wannet cifra hasta en un 8% el SARM hospitalario con LPV (Wannet *et al.*, 2004). Cuando el análisis de prevalencia se realiza en aislamientos seleccionados procedentes de infecciones de piel y tejidos blandos, las prevalencias se pueden acercar al 50%, como en el estudio de Moran realizado en Estados Unidos con muestras de estas localizaciones recogidas en los servicios de urgencias de 11 departamentos de salud (Moran *et al.*, 2006).

Las dos cepas en las que detectamos el gen LPV eran SARM comunitarios (SARM-CO). La LPV ha sido considerada un marcador de aislados comunitarios y se encuentra más relacionada con los SARM, como se demuestra en el estudio de Marimon quién encuentra un 4,4% de productores en SARM frente a un 0,73% en SARM (Marimon *et al.*, 2012). Los dos aislamientos procedían de abscesos cutáneos de pacientes jóvenes sin factores de riesgo. Se trataba de cepas SARM sensibles al resto de antimicrobianos, todas ellas características frecuentes en estos aislados (Cercenado and Ruiz de Gopegui, 2008)(Lina *et al.*, 1999).

El estudio del patrón de bandas obtenido por PFGE (Marimon *et al.*, 2012), mostró que la cepa aislada en el HUR, estaba estrechamente relacionada con la correspondiente al clon USA 300 (perteneciente a la secuencia ST8 por MLST). Este clon es el más relacionado con la diseminación de SARM-CO en Estados Unidos (Tenover *et al.*, 2006), y posteriormente se ha extendido a otros países europeos como Dinamarca (Larsen *et al.*, 2007) o Países Bajos (Wannet *et al.*, 2005). Actualmente en España, el clon más frecuente de SARM-CO está también relacionado con el USA 300 (Cercenado and Ruiz de Gopegui, 2008) y parece que su introducción en España estaría relacionada con inmigrantes de procedencia latinoamericana (Manzur *et al.*, 2008)(Marimon *et al.*, 2012), origen que coincide con uno de los pacientes en los que detectamos la presencia de SARM-CO portador de LPV.

5.3 Acerca de la utilidad de la PCR-RFLP (*coa*, *spa*, *clfB*) en el análisis epidemiológico

El incremento y la diseminación de SARM hacen imprescindible establecer pautas que permitan conocer la prevalencia global de estos aislamientos. Las técnicas de genotipado nos acercan a la situación real y nos ayudan a comprobar si las medidas de prevención aplicadas funcionan. La PFGE se ha considerado la técnica de referencia por su elevado poder de discriminación y su buena correlación con los datos epidemiológicos (Struelens *et al.*, 1992), sin embargo su uso generalizado se ha visto obstaculizado por ser un proceso lento, laborioso y por requerir equipo y personal especializado; al igual que ocurre con la técnica de MLST, por lo que ambas quedan reservadas a laboratorios de referencia.

Los esfuerzos se han centrado en el desarrollo y la estandarización de técnicas de tipado, que ofrezcan resultados comparables a los métodos de referencia y que estén al alcance de laboratorios que dispongan de infraestructura básica, sin necesidad de tener que destinar excesivos recursos (Ugolotti *et al.*, 2011). Los métodos basados en PCR-RFLP se han convertido en una de las alternativas más sencillas y rentables.

Para validar un método de tipificación, éste tiene que cumplir una serie de criterios como son una buena estabilidad, es decir que no genere nuevos patrones a partir de eventos genéticos menores; que tenga un poder de discriminación suficiente, que sea capaz de tipar la mayor parte de las variantes genéticas para esa especie, que los resultados concuerden con los métodos de referencia, y que sea reproducible (van Belkum *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, la estabilidad del marcador se demostró tras obtener idénticos resultados de PCR-RFLP después de descongelar y subcultivar cada una de las cepas en varias ocasiones, tras periodos de almacenamiento diferentes.

En cuanto al poder de discriminación, los resultados que obtuvimos del Índice de Simpson para la coagulasa ($D=0,896$) o para la proteína A ($D=0,832$) fueron inferiores al que resultó de la combinación de ambos marcadores ($D=0,968$); resultado que se incrementó ligeramente al introducir la tercera diana (el *clfB*) alcanzando un valor del 0,979. El análisis conjunto de los tres genes tiene una D muy próxima al 0,989 obtenido mediante el PFGE. Nuestros resultados concuerdan con los de Koreen, quién obtiene un índice de Simpson para la proteína A de 0,973 y para el Clumping factor B de 0,910; y con la combinación de ambos el índice alcanza el 0,995 (Koreen *et al.*, 2005); o como en el estudio de Ugolotti, en el que la combinación de proteína A y clumping factor B, mejora los resultados obtenido con el *clfB* de forma independiente, aunque el valor con ambas dianas sigue siendo bajo ($D=0,730$) ya que tan sólo analiza 33 aislados; y se requiere un mínimo de 100 para obtener resultados fiables (Ugolotti *et al.*, 2011). Por tanto, coincidimos en la necesidad de combinar los resultados de PCR-RFLP de varios marcadores genéticos, tal como recomienda Shopsisin (Shopsisin *et al.*, 2000), ya que con una sola diana no se consigue un poder de discriminación que se acerque lo suficiente al método de referencia (Senn *et al.*, 2011).

Cuando realizamos el genotipado de la proteína A y la coagulasa, se obtuvieron productos de amplificación en las 255 cepas incluidas en el estudio,

sin embargo la tipabilidad del clumping factor B no fue suficiente ya que en 84 aislados no se obtuvieron resultados. En estos casos, se realizó un análisis adicional para el gen del *clfB* con una pareja de cebadores diferente, recomendados por Peacock y colaboradores (Peacock *et al.*, 2002), y que amplifican una secuencia genérica localizada entre 421-444 pb de la cepa Newman, correspondiente a la región A del gen del *clfB*, obteniendo amplificado en todos los casos. La falta de resultados con la primera diana escogida para el tipado en el 33% de las cepas, podría deberse a variaciones en la secuencia de los sitios de reconocimiento de los cebadores, lo cual ya ha sido demostrado en otros genes (Hookey *et al.*, 1998).

Las investigaciones epidemiológicas requieren marcadores genéticos capaces de tipar la práctica totalidad de las cepas analizadas, por lo que en nuestro estudio la diana escogida para el *clfB* no representó un método totalmente adecuado, pero sí nos permitía comparar nuestros resultados con los recogidos en la literatura. Será necesario diseñar nuevas dianas para este gen que mejoren su tipabilidad.

Las técnicas de PCR-RFLP han demostrado una buena correlación con otras técnicas de genotipado ya validadas. En nuestro caso hemos visto que la concordancia entre los dos métodos de genotipado empleados (PCR-RFLP y PFGE) calculado mediante el índice Kappa para las muestras relacionadas con el servicio de Medicina Intensiva, nos dio un valor de $0,887 \pm 0,109$; lo cual indica un grado de acuerdo muy bueno. Por tanto, la combinación de PCR-RFLP (*coa*, *spa*, *clfB*), muestra su valor para su utilización en la vigilancia epidemiológica regional en el contexto de un brote. Otros estudios, como el realizado por Montesinos y colaboradores, han comparado la PCR-RFLP empleando únicamente la coagulasa y la proteína A, con la PFGE obteniendo buenos resultados de concordancia entre métodos (Montesinos *et al.*, 2002). La principal ventaja de la PCR-RFLP es su reproducibilidad y su posibilidad de hacer comparaciones entre laboratorios, así como la reducción del coste y el tiempo de trabajo comparado con el PFGE; por lo que resulta útil en el estudio de brotes nosocomiales.

La reproducibilidad se comprobó mediante el empleo de diferentes lotes de reactivos y equipos, realizando el tipado al menos dos veces en todas las muestras.

5.4 Análisis de la caracterización genotípica de los aislados

Con independencia del método de genotipado utilizado, *S. aureus* presentó una gran variabilidad genética, ya que para los 255 aislados estudiados se definieron un total de 132 genotipos distintos, 99 de los cuales se consideraron únicos, ya que aparecían en un solo aislado para la PCR-RFLP; mientras que para el PFGE se definieron 55 patrones diferentes, 24 de ellos únicos. Esta elevada diversidad genética ya ha sido demostrada por otros estudios, como el publicado por Pérez-Roth, quienes describen en un total de 375 aislados de SARM hospitalario, hasta 47 patrones únicos, utilizando para el tipado PFGE (Perez-Roth *et al.*, 2004); o por Szczuka, los cuales analizando 135 cepas nosocomiales de *S. aureus* mediante PCR-RFLP de los genes *coa* y *spa* encuentran 25 clusters y 32 cepas únicas (Szczuka *et al.*, 2010).

Cuando analizamos cada uno de los genes amplificados mediante PCR-RFLP de forma independiente comprobamos de nuevo esta diversidad genética. Para la coagulasa obtuvimos 32 patrones diferentes para las 255 cepas estudiadas empleando la enzima de restricción *CfoI*, diversidad genética ya demostrada por Hookey empleando esta misma enzima al obtener 10 patrones tras estudiar 95 aislados (Hookey *et al.*, 1998); o por Goh quién empleando para la restricción *AluI* (Goh *et al.*, 1992) obtenía una mayor diversidad, 10 patrones en tan sólo 30 aislados, lo cual contradice los resultados de otros autores que detectan una mayor número de polimórficos con el enzima *CfoI* que con el *AluI* (Hookey *et al.*, 1998).

Para la proteína A encontramos una menor diversidad comparada con la coagulasa, ya que las 255 cepas analizadas presentaron 26 patrones diferentes de digestión. La diversidad encontrada en nuestro estudio es inferior

a la observada por Mitani, que obtiene 9 patrones para la PCR-RFLP de la proteína A al estudiar 39 cepas, empleando el enzima *HhaI*, esquizómero del *CfoI* (Mitani *et al.*, 2005). En el caso de la PCR para el Clumping factor B, obtuvimos 8 patrones diferentes para las 171 cepas en las que se obtuvo amplificado, diversidad inferior a la encontrada por el grupo de Ugolotti que obtuvieron 7 patrones en 67 cepas analizadas (Ugolotti *et al.*, 2011).

Al combinar los tres genes se definieron 132 genotipos diferentes; un número muy superior al obtenido por el grupo de Viana, quienes con el mismo protocolo definen 22 genotipos en 301 cepas de *S. aureus* procedentes de lesiones de conejos. Los estudios realizados con aislados de animales sometidos a un sistema de explotación intensiva, presentan una menor diversidad, ya que la proximidad propicia la diseminación y la clonalidad de los aislados. En concreto, el número de patrones individuales tanto para la proteína A, como para la coagulasa y el clumping factor B fue de 6, 7 y 7 patrones de PCR-RFLP respectivamente (Viana *et al.*, 2007); en otro estudio se obtienen para la proteína A siete patrones al estudiar 93 aislamientos (Soltan-Dallal *et al.*, 2010). Por todo ello coincidimos con Basset y colaboradores, en la alta diversidad de los locis de *clfB* y proteína A que los convierte en buenos marcadores para investigaciones epidemiológicas locales (Basset *et al.*, 2009); lo que sería ampliable al gen de la coagulasa libre. La hipervariabilidad de estos genes los descarta como indicador de evolución del genoma (Hoefnagels-Schuermans *et al.*, 1997), pero si resulta útil para distinguir entre cepas epidémicas y esporádicas.

Cuando analizamos la frecuencia de los genotipos que incluían más de una cepa, el más frecuente en el HUR fue el que denominamos CC₂PIV₃, en el que se agrupaba un 21,7% del total (28/129); 17,8% de las cuales procedían de la comunidad, 14,3% IACS y el resto eran nosocomiales, destacando que el 63% procedían concretamente de la UCI, lo que demuestra que el genotipo al que podía atribuirse el brote, se correspondía con el más frecuente en nuestro Departamento de Salud. También resulta llamativo el hecho de que todas las cepas de este genotipo adquiridas en la comunidad eran meticilin sensibles, y

las aisladas en el hospital resistentes a meticilina, probablemente porque la presión antibiótica hospitalaria ejerce una selección positiva en favor de las cepas SARM (Rehm and Tice, 2010).

Si obviamos las cepas atribuidas al brote, los genotipos predominantes son $CB_1PIV_1Cl_\gamma$, CB_7PIV_3 , $CC_4PIV_1Cl_\beta$, $CC_4PIV_1CL_\gamma$ y CC_5PIV_3 con un 3,9% cada uno de ellos. Los tres primeros aparecen tanto a nivel nosocomial como comunitario, sin embargo CC_5PIV_3 se restringe al área nosocomial y $CC_4PIV_1CL_\gamma$ a fuera de ésta. De cualquier modo, no existe un claro predominio de un genotipo determinado dentro o fuera del ámbito hospitalario.

Para el HCUV el genotipo predominante fue $CC_4PIV_1CL_\gamma$ que agrupaba 14 cepas, todas SARM excepto una, y con patrones de resistencia muy similares. En el HVLA el CB_2PI_6 con un 11,5% de las cepas es el mayoritario y agrupa 6 aislados SASM, mientras que en el HGC el 45,8% de las cepas pertenecen al genotipo $CC_4PII_1Cl_\beta$ que agrupa 10 cepas SARM y una SASM.

En el genotipado realizado mediante PFGE para el HUR, el patrón mayoritario fue el R1, el 87% de las cepas pertenecientes a este genotipo eran de adquisición nosocomial, mientras que el genotipo R14 era el segundo en número de cepas y estaba más asociado a adquisición extrahospitalaria (61%). En el caso del HCUV el mayoritario fue el R7 con el 26,5% que incluía 13 cepas SARM y presentaban todas el tipado por PCR-RFLP $CC_4PIV_1CL_\gamma$. El HVLA tenía agrupadas con el genotipo R23 al 26,4% de sus cepas, todas SASM menos una de ellas; y el HGC el 58,3% en R31, todas SARM excepto una.

En aquellos aislados en los que se amplificaban los tres genes, obtuvimos una mayor resolución en el genotipado por PCR-RFLP respecto al PFGE. Por ejemplo, dentro del patrón R14a que englobó 4 aislados, la técnica PCR-RFLP discriminó 3 subtipos: dos cepas pertenecen al genotipo $CC_4PIV_1Cl_\gamma$, ambas SASM y adquiridas en el ámbito extrahospitalario, mientras

que las otras dos (CC₄PII₆Cl_β y CC₄PII₆Cl_γ), que únicamente difieren en el *clfB*, son SARM asociadas a cuidados sanitarios.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos en estudios previos en los que la tipificación por PFGE proporcionaba una mayor resolución, siendo capaz de distinguir subtipos no detectados por cualquiera de los procedimientos basados en la PCR (Hoefnagels-Schuermans *et al.*, 1997). Sin embargo, en aquellas cepas en las que no se obtuvo amplificado de la PCR del *clfB*, los resultados si que concuerdan con estos autores ya que se obtiene mayor resolución con el PFGE; por ejemplo, en las 28 cepas pertenecientes al subtipo CC₂PIV₃ en el HUR, la PFGE discrimina 3 subtipos: R1 que incluye 18 SARM de adquisición nosocomial (menos una IACS), R5 que incluye 9 SARM de adquisición extrahospitalaria o IACs y una cepa R8 SARM nosocomial.

Podemos concluir que en nuestro análisis los locis *coa*, *spa* y *clfB* por PCR-RFLP representan un método que ofrece información útil en la investigación de una epidemia o brote, aunque para poder comparar con clones predominantes en otros países, este método sirva únicamente como una primera aproximación para conocer la situación epidemiológica y dirigir la búsqueda hacia los métodos de referencia (Montesinos *et al.*, 2002).

5.5 A propósito del brote declarado en el Servicio de Medicina Intensiva

En la segunda quincena del mes de julio de 2007, se produjo un acumulo de aislamientos de SARM procedentes del servicio de Medicina Intensiva del HUR, que mantuvo un goteo de casos hasta la primera semana de agosto; y que pese a darse por erradicado, repuntó de nuevo a finales de noviembre manteniéndose activo hasta febrero de 2008, involucrando a 16 pacientes. La mayoría eran varones (70%), con una edad media de 67 años y todos ellos estaban recibiendo tratamiento antibiótico previo al cultivo positivo de SARM. La mayor parte de estas cepas (72,2%) procedían de aislados respiratorios y se consideraron infecciones, ya que los pacientes presentaban

fiebre y cambios en la consistencia de las secreciones respiratorias; excepto un aislamiento de aspirado traqueal que se valoró como colonización. Los pacientes estaban intubados y recibían ventilación mecánica, por lo que fueron diagnosticados de neumonía asociada a ventilación mecánica (NVM), patología en la que *S. aureus* representa la segunda causa en las unidades de cuidados intensivos (Asensio *et al.*, 2002)(Bouza *et al.*, 2012). El tratamiento de elección en ocho de los pacientes fue linezolid, tres casos se trataron con vancomicina y un cuarto con vancomicina asociada a gentamicina.

Le siguieron en frecuencia los hemocultivos con 3 casos (22,2%), una bacteriemia relacionada con foco urinario al aislarse la misma cepa en una muestra de orina obtenida por sonda; y dos bacteriemias relacionadas con catéter, todas ellas tratadas con linezolid. Se aisló una cepa de SARM en un paciente a partir de una herida quirúrgica, que se consideró como colonización, y que no requirió tratamiento.

Teniendo en cuenta la tasa de incidencia para este patógeno en el Servicio de Intensivos del HUR, rápidamente se consideró la posibilidad de que nos encontrásemos frente a un brote, por lo que se inició su investigación. La primera señal de alarma, como en la mayoría de los casos, fue el incremento de aislados de SARM con idéntico antibiograma, ya que todas las cepas presentaron resistencia *in vitro* a β -lactámicos, eritromicina, clindamicina y ciprofloxacino, tratándose de un fenotipo frecuente entre los SARM de adquisición nosocomial (Heinrich *et al.*, 2011).

La similitud entre los patrones de resistencia hace que el antibiograma resulte poco discriminativo, lo que motivó que recurriésemos al genotipado mediante PCR-RFLP y PFGE para evaluar si nos encontrábamos ante un brote clonal, y si el repunte de casos a partir de noviembre se debía a la cepa responsable de los ocurridos durante el verano, que habría permanecido endémica en la unidad. Los resultados por ambos métodos de tipado demostraron que había una cepa responsable del brote denominada CC2PIV3 por PCR-RFLP o R1 por PFGE.

De las 17 cepas implicadas en el brote, 12 presentaron idéntico genotipo tanto por PCR-RFLP (CC₂PIV₃) como por PFGE (R1), las 5 restantes se consideraron estrechamente relacionadas porque tenían un nivel de homología del 95%, lo que confirma la clonalidad. Pese a tener todas las cepas el mismo antibiograma, se detectaron 4 genotipos distintos, lo que demuestra que tras un mismo antibiograma existe diversidad genética y apoya la necesidad de emplear métodos moleculares si se pretende filiar correctamente un brote. Coincidimos con lo publicado por Boers, quien considera que el empleo de la tipificación molecular de forma rutinaria, puede resultar una inversión en tiempo y dinero no justificada; pero que cuando esta información facilita intervenciones que reducen las infecciones nosocomiales producidas por organismos multirresistentes, la relación coste-beneficio será rentable a medio plazo (Boers *et al.*, 2011).

SARM se transmite entre pacientes y trabajadores sanitarios a través de las manos, del aire y de una gran variedad de superficies y equipos médicos; su epidemiología en las UCI es muy compleja (Dancer *et al.*, 2006). La falta de aislados de origen ambiental o de cultivos de portadores en nuestro estudio, nos impidió conocer el origen de la transmisión cruzada o interpersonal. El HUR no tenía protocolizados cultivos ambientales de manera rutinaria; al no existir asociación conocida entre el número de microorganismos presentes en la superficie del suelo o el aire, y las tasas de infección nosocomial. La conveniencia de la realización de cultivos de vigilancia para búsqueda de portadores, viene condicionada por los datos de prevalencia en cada hospital (Harbarth *et al.*, 2011).

Las medidas a tomar para romper la cadena de transmisión, se consensuaron por un equipo multidisciplinar formado por Microbiólogos, Internistas, Intensivistas y Epidemiólogos, que constituyen la Unidad de Control de Infección Nosocomial del hospital. Fundamentalmente consistieron en el aislamiento de pacientes por cohortes; la mejora de las medidas de asepsia entre el personal encargado de proporcionar cuidados a los enfermos, incidiendo especialmente en el lavado de manos; la limpieza y desinfección del

box utilizado tras el alta, incluyendo superficies horizontales y el entorno del paciente. Con estas medidas se dio por solucionado el brote durante el verano, sin embargo en noviembre de 2007 reapareció la cepa. Se intensificaron las medidas y finalmente se consiguió erradicar el brote, sin que se haya vuelto a producir hasta la fecha.

A pesar de la controversia existente sobre la necesidad o no del cribado universal de SARM en los hospitales, pensamos que en nuestro caso el estudio de portadores tal vez podría haber evitado el segundo pico; coincidimos con otros autores en que podría aplicarse el cribado universal a pacientes que ingresen en unidades de cuidados intensivos, como refieren Rodríguez-Baño o Jarlier (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008)(Jarlier *et al.*, 2010). En otro estudio, realizado por Gilroy, se demuestra que el cribado de SARM de todos los enfermos que ingresaron en la UCI y el aislamiento por cohortes de los pacientes positivos, contribuyó a la prevención de la infección y colonización por SARM en la UCI de su hospital (Gilroy *et al.*, 2009). Si tenemos en cuenta que en nuestro estudio el tiempo de estancia medio se cuadruplicó en los portadores de SARM, con respecto a los SASM; y aún sin tener en consideración otros costes derivados, el cribado en las unidades de críticos parece tener un coste-beneficio positivo.

En las unidades de Medicina Intensiva Neonatal y Pediátricas, donde a los riesgos habituales de infección nosocomial por el uso de dispositivos invasivos y ventilación mecánica, se suma la inmadurez del sistema inmunitario de los pacientes; el estudio de portadores y el empleo de técnicas moleculares de tipado, se consideran indispensables para tratar de evitar o controlar posibles brotes (Heinrich *et al.*, 2011)(Udo *et al.*, 2011)(Brito *et al.*, 2009).

El presente trabajo ha pretendido estudiar una problemática bien conocida a todos los niveles, analizada bajo la experiencia en nuestro centro; confiando en que la información obtenida pueda contribuir a la aplicación de políticas específicas, que permitan controlar estas infecciones en nuestro medio.

6. Conclusiones

Conclusiones

1. El porcentaje de aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina en un Departamento de Salud puede llegar a duplicarse por la aparición de brotes.
2. La detección del gen *mecA* mediante PCR, demostró la presencia de dos cepas portadoras del gen con fenotipo sensible, conocidas como OS-SARM. Sin embargo, consideramos que los estudios de sensibilidad a meticilina realizados de rutina en nuestro laboratorio, resultan adecuados en la práctica clínica; dado el bajo número de discrepancias observadas.
3. La prevalencia de cepas productoras de Leucocidina de Pantón Valentine fue del 1,8% y se asociaron a infecciones de piel y partes blandas de origen comunitario.
4. El método de PCR-RFLP de los genes *coa-spa-clfB* resulta una técnica asequible, de fácil realización e interpretación, que ofrece un nivel de discriminación suficiente para ser utilizado como método de tipado.
5. El índice de Simpson demostrado por el método PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) fue de 0,979; equiparable al 0,989 obtenido por PFGE, lo que avala su utilidad como herramienta de análisis epidemiológico.
6. Los problemas de tipabilidad observados para el gen *clfB*, limitan su utilización y aconsejan el diseño de nuevas dianas para su estudio. El índice de Simpson utilizando los datos de PCR-RFLP de *coa-spa* fue del 0,968; por encima del 0,950 considerado como mínimo deseable; y supone una alternativa válida en el estudio de un brote.

7. El nivel de concordancia entre PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) y PFGE, en el análisis de las muestras del Servicio de Medicina Intensiva del HUR, fue muy bueno con un valor Kappa de $0,887 \pm 0,109$.
8. El genotipado mediante PCR-RFLP (*coa-spa-clfB*) puede demostrar la clonalidad de brotes en servicios asistenciales y relacionar los cultivos clínicos con los datos epidemiológicos, por lo que podría contribuir a la toma de medidas de control de diseminación de estos microorganismos, en el ámbito hospitalario.

7. Bibliografía

- Alder, J.D., 2005. Daptomycin: A New Drug Class for the Treatment of Gram-Positive Infections. *Drugs Today (Barc)* 41, 81-90.
- Ammerlaan, H.S., Kluytmans, J.A., Berkhout, H., Buiting, A., de Brauer, E.I., van den Broek, P.J., van Gelderen, P., Leenders, S.A., Ott, A., Richter, C., Spanjaard, L., Spijkerman, I.J., van Tiel, F.H., Voorn, G.P., Wulf, M.W., van Zeijl, J., Troelstra, A., Bonten, M.J., MRSA Eradication Study Group, 2011. Eradication of Carriage with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Effectiveness of a National Guideline. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2409-2417.
- Arciola, C.R., Visai, L., Testoni, F., Arciola, S., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., 2011. Concise Survey of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors that Promote Adhesion and Damage to Peri-Implant Tissues. *Int. J. Artif. Organs* 34, 771-780.
- Asensio, A., Canton, R., Vaque, J., Rossello, J., Arribas, J.L., 2002. Etiology of Hospital-Acquired Infections in Spanish Hospitals (EPINE, 1990-1999). *Med. Clin. (Barc)* 118, 725-730.
- Bannerman, T.L. and Peacock, S.J. En Murray, P.R. Baron, E.J, Jorgensen, J.H., Landry M.L., Pfaller M.A; 2007. 9th Manual of Clinical Microbiology. ASM Press; pp: 390-404.
- Basset, P., Hammer, N.B., Kuhn, G., Vogel, V., Sakwinska, O., Blanc, D.S., 2009. *Staphylococcus aureus* *clfB* and *Spa* Alleles of the Repeat Regions are Segregated into Major Phylogenetic Lineages. *Infect. Genet. Evol.* 9, 941-947.
- Batista, N., Gutierrez, I., Lara, M., Laich, F., Mendez, S., 2008. Evaluation of the Cefoxitin 30 Microg Disk Diffusion Method for Detection of Methicillin-Resistance in Selected *Staphylococcus aureus* Isolates. *Rev. Esp. Quimioter.* 21, 213-216.
- Bazan, J.A., Martin, S.I., Kaye, K.M., 2011. Newer Beta-Lactam Antibiotics: Doripenem, Ceftobiprole, Ceftaroline, and Cefepime. *Med. Clin. North Am.* 95, 743-60, viii.
- Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S., 2004. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J. Bacteriol.* 186, 4665-4684.
- Bittar, F., Ouchenane, Z., Smati, F., Raoult, D., Rolain, J.M., 2009. MALDI-TOF-MS for Rapid Detection of Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 467-470.
- Blanco, R., Tristan, A., Ezpeleta, G., Larsen, A.R., Bes, M., Etienne, J., Cisterna, 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.
- Boers, S.A., van Ess, I., Euser, S.M., Jansen, R., Tempelman, F.R., Diederens, B.M., 2011. An Outbreak of a Multiresistant Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MR-MSSA) Strain in a Burn Centre: The Importance of Routine Molecular Typing. *Burns* 37, 808-813.

Bibliografía

- Bouza, E., Giannella, M., Bunsow, E., Torres, M.V., Perez Granda, M.J., Martin-Rabadan, P., Munoz, P., on behalf of The Gregorio Maranon Task Force for Pneumonia (GANG), 2012. Ventilator-Associated Pneumonia due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Risk Factors and Outcome in a Large General Hospital. *J. Hosp. Infect.* 80, 150-155.
- Bradley, S.F., 1999. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Long-Term Care Concerns. *Am. J. Med.* 106, 2S-10S; discussion 48S-52S.
- Brito, D.V., von Dolinger, E.J., Abdallah, V.O., Darini, A.L., Gontijo Filho, P.P., 2009. Two Outbreaks of Mixed Etiology Associated with Central Venous Catheters Inserted by Phlebotomy in Critical Neonates. *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 177-182.
- Bronzwaer, S.L., Goettsch, W., Olsson-Liljequist, B., Wale, M.C., Vatopoulos, A.C., Sprenger, M.J., 1999. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS): Objectives and Organisation. *Euro Surveill.* 4, 41-44.
- Broseta, A., Chaves, F., Rojo, P., Otero, J.R., 2006. Emergence of a Single Clone of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Madrid Children. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24, 31-35.
- Cameron, D.R., Howden, B.P., Peleg, A.Y., 2011. The Interface between Antibiotic Resistance and Virulence in *Staphylococcus aureus* and its Impact upon Clinical Outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 53, 576-582.
- Canut, A., Isla, A., Betriu, C., Gascon, A.R., 2012. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Evaluation of Daptomycin, Tigecycline, and Linezolid Versus Vancomycin for the Treatment of MRSA Infections in Four Western European Countries. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* .
- Ceccarelli, G., d'Ettorre, G., Vullo, V., 2011. Purulent Meningitis as an Unusual Presentation of *Staphylococcus aureus* Endocarditis: A Case Report and Literature Review. *Case Report Med.* 2011, 735265.
- Cercenado, E., Ruiz de Gopegui, E., 2008. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26 Suppl 13, 19-24.
- Cercenado, E. En Pahissa, A., 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. *ICG Marge, SL*. pp 33-50.
- Chambers, H.F., Archer, G., Matsushashi, M., 1989. Low-Level Methicillin Resistance in Strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 424-428.
- Chung, M., Antignac, A., Kim, C., Tomasz, A., 2008. Comparative Study of the Susceptibilities of Major Epidemic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Oxacillin and to the New Broad-Spectrum Cephalosporin Ceftobiprole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2709-2717.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S15. NCCLS, Wayne, Pa.
- Coll, P., Coque, M.T., Domínguez, M.A., Vázquez, J., Vila, J., 2005. Métodos Moleculares De Tipificación Epidemiológica En Bacteriología. *Procedimientos en*

Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

- Cookson, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Murchan, S., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M.J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N.J., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Muller-Premru, M., Hryniewicz, W., Rossney, A., O'Connell, B., Short, B.D., Thomas, J., O'Hanlon, S., Enright, M.C., 2007. Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: The HARMONY Collection. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1830-1837.
- Croes, S., Beisser, P.S., Terporten, P.H., Neef, C., Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E., 2010. Diminished in Vitro Antibacterial Activity of Oxacillin Against Clinical Isolates of Borderline Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 979-985.
- Cueto, M., Pascual, A. En Pahissa, A., 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. *ICG Marge, SL*. pp 15-31.
- Cuevas, O., Cercenado, E., Bouza, E., Castellares, C., Trincado, P., Cabrera, R., Vindel, A., Spanish Group for the Study of Staphylococcus, 2007. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: A Multicentre Prevalence Study (2002). *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 250-256.
- Cuevas, O., Cercenado, E., Goyanes, M.J., Vindel, A., Trincado, P., Boquete, T., Marin, M., Bouza, E., Grupo Espanol para el Estudio de Estafilococo, 2008. *Staphylococcus* Spp. in Spain: Present Situation and Evolution of Antimicrobial Resistance (1986-2006). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26, 269-277.
- Cui, L., Lian, J.Q., Neoh, H.M., Reyes, E., Hiramatsu, K., 2005. DNA Microarray-Based Identification of Genes Associated with Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3404-3413.
- Dancer, S.J., Coyne, M., Speekenbrink, A., Samavedam, S., Kennedy, J., Wallace, P.G., 2006. MRSA Acquisition in an Intensive Care Unit. *Am. J. Infect. Control* 34, 10-17.
- Deresinski, S., 2005. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. *Clin. Infect. Dis.* 40, 562-573.
- Domínguez, M.A., Rodríguez-Baño, J., 2006. Infecciones por estafilococos. In: Auxina Ruiz, V., Moreno Guillén, S. (Ed.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp. 263-282.
- Domínguez, M.A., *Staphylococcus aureus*. En Alós, J.I., Cantón, R., Martínez, L., Vila, J., 2009. Eds. *Atlas de Antibiograma*. Biomerieux.University. pp 25-28.
- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., Projan, S.J., 2001. Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the Agr and/or sarA Loci. *J. Bacteriol.* 183, 7341-7353.

- Dunman, P.M., Mounts, W., McAleese, F., Immermann, F., Macapagal, D., Marsilio, E., McDougal, L., Tenover, F.C., Bradford, P.A., Petersen, P.J., Projan, S.J., Murphy, E., 2004. Uses of *Staphylococcus aureus* GeneChips in Genotyping and Genetic Composition Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4275-4283.
- Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J., Gordon, D.B., 2000. Rapid Discrimination between Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Intact Cell Mass Spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 49, 295-300.
- 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.
- Espersen, F., 1985. Complement Activation by Clumping Factor and Protein A from *Staphylococcus aureus* Strain E 2371. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.* 93, 59-64.
- Eveillard, M., de Lassence, A., Lancien, E., Barnaud, G., Ricard, J.D., Joly-Guillou, M.L., 2006. Evaluation of a Strategy of Screening Multiple Anatomical Sites for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at Admission to a Teaching Hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27, 181-184.
- Fosheim, G.E., Nicholson, A.C., Albrecht, V.S., Limbago, B.M., 2011. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Associated Toxin Genes. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3071-3073.
- Frenay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J., Mooi, F.R., 1996. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on the Basis of Protein A Gene Polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 60-64.
- Gao, W., Chua, K., Davies, J.K., Newton, H.J., Seemann, T., Harrison, P.F., Holmes, N.E., Rhee, H.W., Hong, J.I., Hartland, E.L., Steinar, T.P., Howden, B.P., 2010. Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. *PLoS Pathog.* 6, e1000944.
- Geha, D.J., Uhl, J.R., Gustafarro, C.A., Persing, D.H., 1994. Multiplex PCR for Identification of Methicillin-Resistant Staphylococci in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1768-1772.
- Genestier, A.L., Michallet, M.C., Prevost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G., Vallette, F.M., Vandenesch, F., Genestier, L., 2005. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Directly Targets Mitochondria and Induces Bax-Independent Apoptosis of Human Neutrophils. *J. Clin. Invest.* 115, 3117-3127.
- Germel, C., Haag, A., Soderquist, B., 2012. In Vitro Activity of Beta-Lactam Antibiotics to Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 475-480.

- Gilroy, S.A., Miller Stahl, B., Noonan, C., Susman, R., Johnson, L., Kullman, M., Barrington, K., Turchik, J., Mahoney-Clancy, H., Falk, H.J., 2009. Reduction of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection by Cohorting Patients in a Dedicated Unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 203-205.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Review of Application and Interpretation in the Molecular Epidemiology of Infectious Disease. *Infect. Genet. Evol.* 10, 866-875.
- Goh, S.H., Byrne, S.K., Zhang, J.L., Chow, A.W., 1992. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* on the Basis of Coagulase Gene Polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1642-1645.
- Gordon, R.J., Lowy, F.D., 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 46 Suppl 5, S350-9.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2009. Evolving Concepts in Biofilm Infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1034-1043.
- Harbarth, S., Hawkey, P.M., Tenover, F., Stefani, S., Pantosti, A., Struelens, M.J., 2011. Update on Screening and Clinical Diagnosis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 110-117.
- Hardy, K., Price, C., Szczepura, A., Gossain, S., Davies, R., Stallard, N., Shabir, S., McMurray, C., Bradbury, A., Hawkey, P.M., 2010. Reduction in the Rate of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Acquisition in Surgical Wards by Rapid Screening for Colonization: A Prospective, Cross-Over Study. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 333-339.
- Heinrich, N., Mueller, A., Bartmann, P., Simon, A., Bierbaum, G., Engelhart, S., 2011. Successful Management of an MRSA Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 909-913.
- Hernandez Marti, V., Roma Sanchez, E., Salavert Lleti, M., Boso Ribelles, V., Poveda Andres, J.L., 2007. Daptomycin: Revitalizing a Former Drug due to the Need of New Active Agents Against Grampositive Multiresistant Bacterias. *Rev. Esp. Quimioter.* 20, 261-276.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y., Kobayashi, I., 1997. Dissemination in Japanese Hospitals of Strains of *Staphylococcus aureus* Heterogeneously Resistant to Vancomycin. *Lancet* 350, 1670-1673.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T., 2001. The Emergence and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9, 486-493.
- Hoefnagels-Schuermans, A., Peetermans, W.E., Struelens, M.J., Van Lierde, S., Van Eldere, J., 1997. Clonal Analysis and Identification of Epidemic Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Antibiotyping and Determination of Protein A Gene and Coagulase Gene Polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2514-2520.

- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., Parkhill, J., 2004. Complete Genomes of Two Clinical *Staphylococcus aureus* Strains: Evidence for the Rapid Evolution of Virulence and Drug Resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 9786-9791.
- Hookey, J.V., Richardson, J.F., Cookson, B.D., 1998. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA Sequence Analysis of the Coagulase Gene. J. Clin. Microbiol. 36, 1083-1089.
- Hososaka, Y., Hanaki, H., Endo, H., Suzuki, Y., Nagasawa, Z., Otsuka, Y., Nakae, T., Sunakawa, K., 2007. Characterization of Oxacillin-Susceptible mecA-Positive *Staphylococcus aureus*: A New Type of MRSA. J. Infect. Chemother. 13, 79-86.
- Huda, T., Nair, H., Theodoratou, E., Zgaga, L., Fattom, A., El Arifeen, S., Rubens, C., Campbell, H., Rudan, I., 2011. An Evaluation of the Emerging Vaccines and Immunotherapy Against Staphylococcal Pneumonia in Children. BMC Public Health 11 Suppl 3, S27.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: An Application of Simpson's Index of Diversity. J. Clin. Microbiol. 26, 2465-2466.
- Ikeda-Dantsuji, Y., Nakae, T., Ariyoshi, K., Mizuno, H., Moriyama, H., Nagura, O., Suwabe, A., Fukuchi, K., Honda, J., Kaku, M., Kohno, S., Mikamo, H., Niki, Y., Takesue, Y., Tomono, K., Yanagihara, K., Hanaki, H., 2012. Limited Detectability of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* by the Etest Method and its Improvement using Enriched Media. J. Med. Microbiol. .
- Immerman, I., Ramos, N.L., Katz, G.M., Hutzler, L.H., Phillips, M.S., Bosco, J.A., 3rd, 2012. The Persistence of *Staphylococcus aureus* Decolonization After Mupirocin and Topical Chlorhexidine: Implications for Patients Requiring Multiple Or Delayed Procedures. J. Arthroplasty .
- Iverson, A.R., Boyd, K.L., McAuley, J.L., Plano, L.R., Hart, M.E., McCullers, J.A., 2011. Influenza Virus Primes Mice for Pneumonia from *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 203, 880-888.
- Jackson, K.A., Edwards-Jones, V., Sutton, C.W., Fox, A.J., 2005. Optimisation of Intact Cell MALDI Method for Fingerprinting of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J. Microbiol. Methods 62, 273-284.
- Jarlier, V., Trystram, D., Brun-Buisson, C., Fournier, S., Carbonne, A., Marty, L., Andreumont, A., Arlet, G., Buu-Hoi, A., Carlet, J., Decre, D., Gottot, S., Gutmann, L., Joly-Guillou, M.L., Legrand, P., Nicolas-Chanoine, M.H., Soussy, C.J., Wolf, M., Lucet, J.C., Aggoune, M., Brucker, G., Regnier, B., Collegiale de Bacteriologie-Virologie-Hygiene des Hopitaux Universitaires de l'ile de France, 2010. Curbing

- Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French Hospitals through a 15-Year Institutional Control Program. *Arch. Intern. Med.* 170, 552-559.
- Kaech, C., Elzi, L., Sendi, P., Frei, R., Laifer, G., Bassetti, S., Fluckiger, U., 2006. Course and Outcome of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia: A Retrospective Analysis of 308 Episodes in a Swiss Tertiary-Care Centre. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 345-352.
- Klevens, R.M., Morrison, M.A., Fridkin, S.K., Reingold, A., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J.M., Craig, A.S., Fosheim, G., McDougal, L.K., Tenover, F.C., Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network, 2006. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Healthcare Risk Factors. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1991-1993.
- Koessler, T., Francois, P., Charbonnier, Y., Huyghe, A., Bento, M., Dharan, S., Renzi, G., Lew, D., Harbarth, S., Pittet, D., Schrenzel, J., 2006. Use of Oligoarrays for Characterization of Community-Onset Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1040-1048.
- Kondoh, K., Furuya, D., Yagihashi, A., Uehara, N., Nakamura, M., Kobayashi, D., Tsuji, N., Watanabe, N., 2002. Comparison of Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction and Pulse-Field Gel Electrophoresis for Characterizing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 62-67.
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A., Kreiswirth, B.N., 2005. Comparative Sequencing of the Serine-Aspartate Repeat-Encoding Region of the Clumping Factor B Gene (*clfB*) for Resolution within Clonal Groups of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3985-3994.
- Krishna, B.V., Smith, M., McIndeor, A., Gibb, A.P., Dave, J., 2008. Evaluation of Chromogenic MRSA Medium, MRSA Select and Oxacillin Resistance Screening Agar for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Pathol.* 61, 841-843.
- Kuhn, G., Francioli, P., Blanc, D.S., 2007. Double-Locus Sequence Typing using *clfB* and *Spa*, a Fast and Simple Method for Epidemiological Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 54-62.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K., 2001. Whole Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225-1240.
- Lagace-Wiens, P.R., Alfa, M.J., Manickam, K., Harding, G.K., 2008. Reductions in Workload and Reporting Time by use of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Screening with MRSASelect Medium Compared to Mannitol-Salt Medium Supplemented with Oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1174-1177.

Bibliografia

- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Larsen, A., Stegger, M., Goering, R., Sorum, M., Skov, R., 2007. Emergence and Dissemination of the Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Clone in Denmark (2000-2005). *Euro Surveill.* 12.
- Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, 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, 1128-1132.
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S.E., Daum, R.S., Fridkin, S.K., Gorwitz, R.J., Kaplan, S.L., Karchmer, A.W., Levine, D.P., Murray, B.E., J Rybak, M., Talan, D.A., Chambers, H.F., 2011. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children: Executive Summary. *Clin. Infect. Dis.* 52, 285-292.
- Loffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Bruck, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B.C., Proctor, R.A., Peters, G., 2010. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin is a very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. *PLoS Pathog.* 6, e1000715.
- Mangili, A., Bica, I., Snyderman, D.R., Hamer, D.H., 2005. Daptomycin-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1058-1060.
- Manzur, A., Dominguez, A.M., Pujol, M., Gonzalez, M.P., Limon, E., Hornero, A., Martin, R., Gudiol, F., Ariza, J., 2008. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: An Emerging Threat in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 377-380.
- Marimon, J.M., Villar, M., Garcia-Arenzana, J.M., Caba Ide, L., Perez-Trallero, E., 2012. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Carrying the Panton-Valentine Leucocidin Genes in Northern Spain. *J. Infect.* 64, 47-53.
- Massidda, O., Montanari, M.P., Mingoia, M., Varaldo, P.E., 1996. Borderline Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains have More in Common than Reduced Susceptibility to Penicillinase-Resistant Penicillins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2769-2774.
- Millar, B.C., Loughrey, A.; Elborn, J.S.; Moore, J.E.; 2007. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J. Hosp. Infect.* 67, 109-113.
- Mitani, N., Koizumi, A., Sano, R., Masutani, T., Murakawa, K., Mikasa, K., Okamoto, Y., 2005. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its Usefulness in an Epidemiological Study of an Outbreak. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 250-252.
- Montesinos, I., Salido, E., Delgado, T., Cuervo, M., Sierra, A., 2002. Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel

- Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2119-2125.
- Moran, G.J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., McDougal, L.K., Carey, R.B., Talan, D.A., EMERGENCY ID Net Study Group, 2006. Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections among Patients in the Emergency Department. *N. Engl. J. Med.* 355, 666-674.
- Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fushing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G., Cookson, B., 2003. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and its Application for Tracing the Spread of Related Strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1574-1585.
- Murray, P.R., 2010. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Usefulness for Taxonomy and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1626-1630.
- Naimi, T.S., LeDell, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boxrud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Danila, R.N., Lynfield, R., 2003. Comparison of Community- and Health Care-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *JAMA* 290, 2976-2984.
- Navarro, M.B., Huttner, B., Harbarth, S., 2008. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Control in the 21st Century: Beyond the Acute Care Hospital. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 372-379.
- Ogston, A., 1882. Micrococcus Poisoning. *J. Anat. Physiol.* 17, 24-58.
- Otter, J.A., French, G.L., 2010. Molecular Epidemiology of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 10, 227-239.
- Otto, M., 2008. Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 207-228.
- Patti, J.M., 2011. Will we Ever See the Approval of a *Staphylococcus aureus* Vaccine? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 845-846.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G., Day, N.P., 2002. Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70, 4987-4996.
- Perez-Roth, E., Lorenzo-Diaz, F., Batista, N., Moreno, A., Mendez-Alvarez, S., 2004. Tracking Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones during a 5-Year Period (1998 to 2002) in a Spanish Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4649-4656.
- Petti, C.A., Carroll, K.C., Reime, R.L.G. En Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. 2007. 9th Manual of Clinical Microbiology. ASM Press; pp: 55-61.

Bibliografía

- Rehm, S.J., Tice, A., 2010. *Staphylococcus aureus*: Methicillin-Susceptible *S. aureus* to Methicillin-Resistant *S. aureus* and Vancomycin-Resistant *S. aureus*. Clin. Infect. Dis. 51 Suppl 2, S176-82.
- Robotham, J.V., Graves, N., Cookson, B.D., Barnett, A.G., Wilson, J.A., Edgeworth, J.D., Batra, R., Cuthbertson, B.H., Cooper, B.S., 2011. Screening, Isolation, and Decolonisation Strategies in the Control of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units: Cost Effectiveness Evaluation. BMJ 343, d5694.
- Rodriguez-Baño, J., Bischofberger, C., Alvarez-Lerma, F., Asensio, A., Delgado, T., Garcia-Arcal, D., Garcia-Ortega, L., Hernandez, M.J., Molina-Cabrillana, J., Perez-Canosa, C., Pujol, M., M. Pujol and Grupos de Estudio de Infeccion Hospitalaria (GEIH) and de Infeccion en el Paciente Critico (GEIPC) of Sociedad Espanola de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (SEIMC) and Sociedad Espanola de Medicina Preventiva, Salud Publica e Higiene (SEMSPSPH), 2008. Surveillance and Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish Hospitals. A GEIH-SEIMC and SEMSPSPH Consensus Document. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 26, 285-298.
- Rodriguez-Baño, J., Millan, A.B., Dominguez, M.A., Almirante, B., Cercenado, E., Padilla, B., Pujol, M., GEIH/GEMARA/REIPI, 2006. Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish Hospitals. A Survey from the MRSA 2003 GEIH/GEMARA/REIPI Project. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 24, 149-156.
- Rossney, A.S., Shore, A.C., Morgan, P.M., Fitzgibbon, M.M., O'Connell, B., Coleman, D.C., 2007. The Emergence and Importation of Diverse Genotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Harboring the Panton-Valentine Leukocidin Gene (Pvl) Reveal that Pvl is a Poor Marker for Community-Acquired MRSA Strains in Ireland. J. Clin. Microbiol. 45, 2554-2563.
- Saha, B., Singh, A.K., Ghosh, A., Bal, M., 2008. Identification and Characterization of a Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Kolkata (South Asia). J. Med. Microbiol. 57, 72-79.
- Schumacher-Perdreau, F., Jansen, B., Seifert, H., Peters, G., Pulverer, G., 1994. Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Teaching Hospital--Epidemiological and Microbiological Surveillance. Zentralbl. Bakteriol. 280, 550-559.
- Senn, L., Zanetti, G., Bally, F., Chuard, C., Cometta, A., Burr, M., Eisenring, M.C., Basset, P., Blanc, D.S., 2011. Investigation of Classical Epidemiological Links between Patients Harboring Identical, Non-Predominant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Genotypes and Lessons for Epidemiological Tracking. J. Hosp. Infect. 79, 202-205.
- Shane, A.L., Hansen, N.I., Stoll, B.J., Bell, E.F., Sanchez, P.J., Shankaran, S., Laptook, A.R., Das, A., Walsh, M.C., Hale, E.C., Newman, N.S., Schrag, S.J., Higgins, R.D., for the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2012. Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Meningitis in Preterm Infants. Pediatrics 129, e914-e922.
- Shopsin, B., Gomez, M., Waddington, M., Riehman, M., Kreiswirth, B.N., 2000. Use of Coagulase Gene (*Coa*) Repeat Region Nucleotide Sequences for Typing of

- Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. J. Clin. Microbiol. 38, 3453-3456.
- Siberry, G.K., Tekle, T., Carroll, K., Dick, J., 2003. Failure of Clindamycin Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Expressing Inducible Clindamycin Resistance in Vitro. Clin. Infect. Dis. 37, 1257-1260.
- Sivakumar, B., Vijaysegaran, P., Chaudhuri, A., Crawford, S., Ottley, M., 2012. Daptomycin Resistance in Prosthetic Joint Infections. Orthopedics 35, e603-6.
- Smith, E.J., Corrigan, R.M., van der Sluis, T., Grundling, A., Speziale, P., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., 2012. The Immune Evasion Protein Sbi of *Staphylococcus aureus* Occurs both Extracellularly and Anchored to the Cell Envelope by Binding Lipoteichoic Acid. Mol. Microbiol. 83, 789-804.
- Soltan-Dallal, M.M., Salehipour, Z., Mehrabadi, J.F., 2010. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Food Samples Based on the Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequence. Can. J. Microbiol. 56, 18-21.
- Soriano, A., Marco, F., Martinez, J.A., Pisos, E., Almela, M., Dimova, V.P., Alamo, D., Ortega, M., Lopez, J., Mensa, J., 2008. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clin. Infect. Dis. 46, 193-200.
- Struelens, M.J., Deplano, A., Godard, C., Maes, N., Serruys, E., 1992. Epidemiologic Typing and Delineation of Genetic Relatedness of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Macrorestriction Analysis of Genomic DNA by using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 30, 2599-2605.
- Sturenburg, E., 2009. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Clinical Samples: Methods, Effectiveness and Cost Considerations. Ger. Med. Sci. 7, Doc06.
- Sykes, R., 2010. The 2009 Garrod Lecture: The Evolution of Antimicrobial Resistance: A Darwinian Perspective. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1842-1852.
- Szabo, J.; Dombradi, Z.; Dobay, O.; Orosi, P.; Konya, J.; Nagy, K.; Rozgonyi, F.; 2009. Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28, 129-136.
- Szczuka, E., Szumala-Kakol, A., Siuda, A., Kaznowski, A., 2010. Clonal Analysis of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in Obstetric-Gynaecological Hospital. Pol. J. Microbiol. 59, 161-165.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.
- Tenover, F.C., Weigel, L.M., Appelbaum, P.C., McDougal, L.K., Chaitram, J., McAllister, S., Clark, N., Killgore, G., O'Hara, C.M., Jevitt, L., Patel, J.B.,

Bibliografia

- Bozdogan, B., 2004. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 275-280.
- Tenover, F.C., McDougal, L.K., Goering, R.V., Killgore, G., Projan, S.J., Patel, J.B., Dunman, P.M., 2006. Characterization of a Strain of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Widely Disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44, 108-118.
- Toh, S.M., Xiong, L., Arias, C.A., Villegas, M.V., Lolans, K., Quinn, J., Mankin, A.S., 2007. Acquisition of a Natural Resistance Gene Renders a Clinical Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to the Synthetic Antibiotic Linezolid. *Mol. Microbiol.* 64, 1506-1514.
- Tomasz, A., Drugeon, H.B., de Lencastre, H.M., Jabes, D., McDougall, L., Bille, J., 1989. New Mechanism for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical Isolates that Lack the PBP 2a Gene and Contain Normal Penicillin-Binding Proteins with Modified Penicillin-Binding Capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1869-1874.
- Torres, C., 2002. Interpretative Reading of the Antibiogram in Gram-Positive Cocci. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20, 354-63; quiz 363-4.
- Udo, E.E., Aly, N.Y., Sarkhoo, E., Al-Sawan, R., Al-Asar, A.S., 2011. Detection and Characterization of an ST97-SCCmec-V Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone in a Neonatal Intensive Care Unit and Special Care Baby Unit. *J. Med. Microbiol.* 60, 600-604.
- Ugolotti, E., Bandettini, R., Marchese, A., Gualco, L., Vanni, I., Borzi, L., Di Marco, E., Castagnola, E., Melioli, G., Biassoni, R., 2011. Molecular Characterization of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in Pediatric Outbreaks using Variable Tandem Repeat Analysis with *Spa* and *Cfb* Typing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 213-217.
- van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), 2007. Guidelines for the Validation and Application of Typing Methods for use in Bacterial Epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13 Suppl 3, 1-46.
- van Rijen, M.M., Bonten, M., Wenzel, R.P., Kluytmans, J.A., 2008. Intranasal Mupirocin for Reduction of *Staphylococcus aureus* Infections in Surgical Patients with Nasal Carriage: A Systematic Review. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 254-261.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E., Etienne, J., 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 978-984.
- Varshney, A.K., Martinez, L.R., Hamilton, S.M., Bryant, A.E., Levi, M.H., Gialanella, P., Stevens, D.L., Fries, B.C., 2010. Augmented Production of Panton-Valentine Leukocidin Toxin in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible

- Staphylococcus aureus* is Associated with Worse Outcome in a Murine Skin Infection Model. *J. Infect. Dis.* 201, 92-96.
- Viana, D., Selva, L., Segura, P., Penades, J.R., Corpa, J.M., 2007. Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Rabbit Lesions. *Vet. Microbiol.* 121, 288-298.
- Vindel, A., Cuevas, O., Cercenado, E., Marcos, C., Bautista, V., Castellares, C., Trincado, P., Boquete, T., Perez-Vazquez, M., Marin, 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.
- Voyich, J.M., Otto, M., Mathema, B., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Welty, D., Long, R.D., Dorward, D.W., Gardner, D.J., Lina, G., Kreiswirth, B.N., DeLeo, F.R., 2006. Is Panton-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? *J. Infect. Dis.* 194, 1761-1770.
- Waldvogel, F.A. En Mandell, G.L., Dolin, L., Bennett, J.R. 2002. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. Ed. Médica Panamericana. pp 2513-2538.
- Wannet, W.J., Heck, M.E., Pluister, G.N., Spalburg, E., van Santen, M.G., Huijsdens, X.W., Tiemersma, E., de Neeling, A.J., 2004. Panton-Valentine Leukocidin Positive MRSA in 2003: The Dutch Situation. *Euro Surveill.* 9, 28-29.
- Wannet, W.J., Spalburg, E., Heck, M.E., Pluister, G.N., Tiemersma, E., Willems, R.J., Huijsdens, X.W., de Neeling, A.J., Etienne, J., 2005. Emergence of Virulent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3341-3345.
- Wertheim, H.F., Walsh, E., Choudhury, R., Melles, D.C., Boelens, H.A., Miajlovic, H., Verbrugh, H.A., Foster, T., van Belkum, A., 2008. Key Role for Clumping Factor B in *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization of Humans. *PLoS Med.* 5, e17.
- Wichelhaus, T.A., Hunfeld, K.P., Boddingtonhaus, B., Kraiczy, P., Schafer, V., Brade, V., 2001. Rapid Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22, 294-298.
- Witte, W., Braulke, C., Cuny, C., Strommenger, B., Werner, G., Heuck, D., Jappe, U., Wendt, C., Linde, H.J., Harmsen, D., 2005. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine Leukocidin Genes in Central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 1-5.
- Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., Christner, M., 2011. MALDI-TOF MS Fingerprinting Allows for Discrimination of Major Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 64-68.
- Wyllie, D., Paul, J., Crook, D., 2011. Waves of Trouble: MRSA Strain Dynamics and Assessment of the Impact of Infection Control. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2685-2688.